

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München
Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

**CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
AM WALKER - CARCINOM**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marie-Luise Meiners
aus Berlin

München 1965

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Büngeler

CYTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM WALKER - CARCINOM

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Marie-Luise Meiners
aus Berlin

München 1965

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Wrba
Co-Referent: Prof. Dr. W. Büngeler
Dekan: Prof. Dr. R. Zenker

Tag der mündlichen Prüfung: 21. XI. 1965



Bei Herrn Professor Wrba möchte ich mich sehr herzlich bedanken, daß ich in seiner Abteilung arbeiten durfte und hierdurch die Möglichkeit hatte, einen kleinen Einblick in die experimentelle Krebsforschung zu bekommen. Frau Dr. Eicke möchte ich für ihre freundliche Einführung in dieses interessante Gebiet und für sehr wertvolle Hinweise und Anregungen, die sie mir gegeben hat, danken. Auch möchte ich Herrn H. Hampe, Fotograf des Institutes, für seine Mithilfe meinen Dank aussprechen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

DISPOSITION

	Seite
A. Einleitung	7
B. Historischer Überblick	8
C. Das Chromosom	12
I. Chromosomenzahl und Chromosomengröße	13
II. Die Einschnürung	14
III. Normales Ratten-, Maus- und Hamstergenom	15
D. Material und Methodik	16
E. Versuchsergebnisse	18
I. Veränderungen des Chromosomensatzes des Walker-Carcinoms (Stamm W) als Folge der Heterotransplantation auf Ratten, Mäuse und Goldhamster.	18
II. Veränderungen des Chromosomensatzes des Walker-Carcinoms (Heidelberger Stamm) als Folge der Reimplantation des in vitro gehaltenen Stammes ins Tier.	24
F. Diskussion	29
G. Zusammenfassung	37
H. Literaturverzeichnis	39
I. Abbildungen	51

Einleitung

Die Zellen von Tumorgeweben zeigen eindeutig Unterschiede im Verhalten zu denen normaler Gewebe. Sie weichen in bezug auf Chromosomenzahl und Chromosomenform wesentlich ab und sind häufig zusätzlich ausgezeichnet durch eine numerische und strukturelle Variabilität der Chromosomen. Die Bedeutung dieser Abweichungen für die Tumorentstehung und Tumorprogression ist umstritten; ob numerische und strukturelle Veränderungen charakteristisch oder gar Voraussetzung für alle Tumoren sind, kann noch nicht entschieden werden.

Besonders in den letzten Jahren, erleichtert einmal durch die Verbesserung der Präparationsmethoden, besonders durch Einführung von Vorbehandlung der lebenden Zelle, z.B. mit Colchicin, hypotonischen Lösungen oder Hyaluronidase, ferner durch die verbesserten Fixierungs- und Färbeverfahren, zum zweiten vor allem durch die Entdeckung, daß Ascitestumoren wesentlich genauere Chromosomenanalysen als solide Tumoren erlauben, haben cytologische Untersuchungen von Tumorzellen in der Krebsforschung mehr und mehr an Interesse gewonnen. Es besteht die Hoffnung, durch die so intensiv betriebene Chromosomenforschung, für die doch scheinbar weitgehend ausgeschalteten oder wenigstens abgeschwächten Gesetzmäßigkeiten der Zahlen- und Formkonstanz, wie sie in Tumorzellen zu herrschen scheinen, Gründe zu finden.

Die Untersuchungen werden an transplantablen Tumoren, sowohl menschlichen als auch tierischen Ursprungs durchgeführt. Hier soll speziell auf Versuche an Tiertumoren eingegangen werden.

Es ist mir die Aufgabe gestellt worden, zwei Stämme des Walker-Carcinoms der Ratte und deren Verhalten bei geänderten Umweltbedingungen zu untersuchen. Der Wechsel der Milieubedingungen wird bei einem Stamm durch Heterotransplantation des Tumors auf Ratten, Mäuse und Hamster geschaffen; bei dem zweiten Stamm durch dessen Reimplantation von in-vitro-Kulturen ins Tier.

Historischer Überblick

Schon von Hanse mann (49) am Ende des vorigen Jahrhunderts und später, 1912, Boveri (10) versuchen eine Beziehung zwischen Chromosomen-Aberrationen und dem Ursprung von Tumoren zu finden. Winge (1930) (138) ist der erste Cytologe, der das Tumorgewebe als eine heterologe Zellpopulation ansieht und der behauptet, daß die Entstehung und das Wachstum eines Tumors die Folge von selektiven Prozessen innerhalb dieser Population seien. Er sagt in seiner Arbeit über die Natur maligner Tumoren: "Ich betrachte den malignen Tumor als bestehend aus Abkömmlingszellen von einer oder mehreren Zellen, die durch eine lokale Reizung einen abnormen Chromosomenbestand bekommen haben, in dem besonders häufig ein Verlust verschiedener Chromosomen eingetreten ist, was eine vergrößerte Wachstumsintensität und im übrigen einen gestörten Metabolismus mit sich führen kann." Dieser Satz weist schon deutlich auf das heute geltende stemline-Konzept hin. Durch die genetische Variation eines Tumors, die sich in den regelwidrigen Mitosen zeigt, wird ein Anstoß zur Virulenzvermehrung gegeben: "Es geschieht während des Vordringens maligner Gewebe eine Selektion unter den aberranten Zellen." Winge behauptet weiter, daß mit Anwachsen der Polyploidie auch die Malignität eines Tumors zunimmt. Winge's, eigentlich für seine Zeit mit ihren Möglichkeiten der cytologischen Untersuchungen noch als "Hypothesen" zu bezeichnenden Feststellungen, bilden den Grundstein aller weiteren Forschungen auf diesem Gebiet, die im weiten Umfange begonnen und heute fast das Kernstück zur Frage der Entstehung und Entwicklung von Tumorzellen bilden.

Es ist klar, daß das Tier als "Versuchsobjekt" unentbehrlich ist. Mit ihm steht mehr Material zur Verfügung, außerdem sind wesentlich ausgedehntere Manipulationsmöglichkeiten gegeben. Es besteht die Möglichkeit, Tumormaterial menschlichen Ursprungs auf das Tier zu übertragen und dort die weitere Entwicklung zu beobachten; weiter, Tiertumoren, die entweder spontan gewachsen sind oder durch bestimmte Reize erzeugt werden, auf ihr Chromosomenverhalten, ihre Eigenschaften, ihre biochemischen Leistungen hin zu analysieren. Wie schon gesagt, sollen hier nur Untersuchungen an transplantablen tierischen Tumoren - speziell am Walker-Carcinom der Ratte - beschrieben werden.

Cytologische Analysen transplantabler tierischer Tumoren werden besonders mit Mäuse- und Ratten-Tumoren durchgeführt. Ganz allgemein bestätigt sich in allen Transplantationsversuchen, daß sie durch eine ausgeprägte numerische und strukturelle Variabilität der Chromosomen ausgezeichnet sind. Die Chromosomenzahlen neoplastischer Zellpopulationen sind nicht uniform, sondern pendeln um einen Mittelwert, die s-Zahl (stemline-number). Chromosomenmorphologisch treten in Tumorzellen transplantabler Tumoren entweder neue Chromosomentypen auf, die sog. Markierungschromosomen, oder es

können die scheinbar normalen Chromosomen feinere kryptostrukturelle Veränderungen aufweisen. Die intraindividuelle, numerische und strukturelle Variation neoplastischer Gewebe führt zur Entstehung außerordentlich vielgestaltiger Chromosomenkomplemente. Daher bestehen die einzelnen transplantablen Tumoren in der Regel aus heterogenen Zellpopulationen, nicht aus einer Ansammlung cytogenetisch identischer Zellen. Es stellen sich nach gewisser Zeit unter einheitlichen Wachstumsbedingungen stabile Gleichgewichte ein. Die Chromosomenmuster erfahren aber im Laufe von Passagen auf art-eigenen und besonders auf artfremden Tieren Veränderungen. Diese betreffen alle karyologischen Merkmale der Tumoren: die s-Zahl, das Ausmaß der aneuploiden Varianten, Gehalt an Markierungschromosomen, kryptostrukturelle Variationen usw., so daß Tumorklinien gleichen Ursprungs auf diese Weise fast ebenso große chromosomale Differenzen aufweisen können wie Tumoren, die von derselben Tierart, aber von verschiedenen Geweben abstammen. Entsprechende Ergebnisse bei homologer Transplantation gewann u. a. Levan (1956c) (88), der mit dem Ehrlich-Ascites-Tumor experimentierte, bei dem eine Verschiebung der s-line infolge Transplantation auftrat. Hansen-Melander (1958) (50) beobachtete stemline-Veränderungen und das Auftreten eines Markierungschromosoms im Verlaufe homologer Transplantationen des Landschütz-Tumors. Kaziwaras (1954) (73) und Sachs und Gallily (1956) (119) zeigen anhand ihrer Ergebnisse, daß es gelegentlich zu einer Verschiebung der Polyploidiestufe beim Übergang auf eine genetisch abweichende Rasse kommt. Über die ersten erfolgreichen Beobachtungen bei Heterotransplantationen berichten Ahlström und Ising (1956) (2) und Ising (1958) (70). Ising führt ihre Transplantationsversuche hauptsächlich mit Unterlinien des Ehrlich-Ascites-Carcinoms durch. Sie überimpft diese auf Ratten und Hamster und analysiert die Tumoren jeweils nach der 20. - 30. Passage. Sie kann sowohl numerische als auch strukturelle Veränderungen in der Zusammensetzung der Zellpopulationen feststellen, schließlich geht eine Herabsetzung der Chromosomenzahl auch mit einer Reduktion der totalen Chromosomenlänge einher.

Cytologische Analysen an Gewebekulturen, wie sie von Ford und Mitarbeitern (1958, 1959, 1961) (34, 35, 36, 37), Hsu (1960) (60), Hsu und Mitarbeitern (1957 - 1961) (61, 62, 63, 64, 65, 66) und besonders von Levan und Biesele (1958) (90) durchgeführt wurden, zeigen eine auffällige Parallele im Verhalten der Chromosomenkomplemente zu den transplantablen Tumoren. Die erwähnten Autoren machen ihre Untersuchungen mit normalen tierischen und menschlichen Geweben, die sie in in-vitro-Kulturen explantieren und zeigen übereinstimmend, daß die diploide somatische Chromosomenzahl meist nicht beibehalten wird, sondern heteroploide Chromosomenzahlen, die sich um eine bestimmte Stammlinie der Tumorpopulation entsprechenden Zahl gruppieren, entstehen. Weiter beobachten sie das Entstehen neuer Chromosomentypen, den Markierungschromosomen transplantabler Tumoren entsprechend. Ähnlich wie die in-

vitro-Kulturen normaler Gewebe verhalten sich Gewebekulturen maligner Tumoren. Wie es besonders Hsu und Moorhead (1957) (65), sowie Chu und Giles (1958) (14) für HeLa, Hsu und Klatt (1959) (62) für ein Hepatom der Ratte und Elly und Gray (1961) (30) für das Krebs-2-Carcinom gezeigt haben, wird im Verlaufe ihrer Gewebekulturen vor allem die s-Zahl verändert, z. T. treten aber auch morphologische Differenzen auf. Beobachtungen an malignen Tumoren, die in-vitro gehalten und dann in Tiere implantiert wurden, sind bisher in Bezug auf Veränderungen des Chromosomensatzes als Folge dieser drastischen Änderung der Milieubedingungen wenig in der Literatur beschrieben. Dawe und Mitarbeiter (1958) (21) berichten über Untersuchungen, die sie an einem bei der Maus künstlich erzeugten Reticulum-Zell-Sarcom in dieser Versuchsanordnung durchführen. Ihre Ergebnisse stimmen mit unseren (29) Untersuchungen am Walker-Carcinom vom Heidelberger Stamm weitgehend überein. Auch sie beobachten die gleichzeitige Entwicklung einer annähernd hypotetraploiden und einer fast diploiden Stammlinie. Sie sehen ebenfalls deutlich eine fortschreitende Abnahme in der Virulenz der Geschwulst und verminderte Fähigkeit zu Tumorzustand bei Reimplantation des in-vitro gewachsenen Stammes in die Maus. (Die Versuchsergebnisse der Untersuchungen am Walker-Carcinom vom Heidelberger Stamm werden später ausführlich besprochen.) Versuche in dieser Richtung wurden aber meist nur gemacht, um zu sehen, ob über Jahre in-vitro gehaltene Stämme ihre carcinogenen Eigenschaften beibehalten haben, ob diese evtl. gesteigert wurden, oder ganz aufgehört haben. Solche Untersuchungen beschreiben u. a. Earle und Mitarbeiter (1943, 1950) (25, 26) und Sanford und Mitarbeiter (1954, 1956) (120, 121). Hilwig (1959) (58) beschreibt die spontane Aufteilung eines Rattensarkoms in morphologisch verschiedene Unterstämme und deren Verhalten in der Gewebekultur. Sie sagt, daß die in vitro explantierten Tumorzellen zwar Tumorzellen bleiben, aber die Fähigkeit besitzen, sich morphologisch zu verändern; und weiter, daß die nach einer unbestimmten Entwicklungszeit für einen längeren Zeitraum stationäre Zell- und Wachstumsform auch nach Unterbrechung des Wachstums in vitro durch eine Tierpassage erhalten bleibt.

Die einfachste Erklärung für die Entstehung der heterologen Struktur neoplastischer Zellpopulationen, die relative Stabilität und die Ursachen für ihre Veränderungen, gibt das sog. stemline-Konzept, welches bereits 1930 durch die Arbeiten von Winge (138) vorbereitet und heute von Levan und Hauschka (91) vertreten wird, die es aufgrund ihrer Untersuchungen geändert und erweitert haben. Danach spiegeln die relativen Häufigkeiten der verschiedenen chromosomalen Varianten eines Tumors den Grad ihrer Anpassung an die Wachstumsbedingungen wider, unter denen sich der Tumor entwickelt hat (Wirtstier, in vitro-Kulturen). Die häufigsten Zellen, die stemline- oder s-Zellen, sind am besten an das maligne Wachstum angepaßt und tragen deshalb am meisten zur Entwicklung des Tumors bei. Es wird weiter angenommen, daß die Zellen dauernd neue Variationen produzieren und so die heterogene Struktur des neoplastischen Gewebes aufrechterhalten. Die rela-

tive Häufigkeit der s-Zahlen variiert allerdings bei den verschiedenen Tumorklinen beträchtlich. Die Frequenzkurven können gut ausgeprägte Gipfel aufweisen oder sehr flach sein, im letzteren Fall wird dann eine bestimmte s-Zelle durch eine ganze Zellgruppe ersetzt. Es scheint kein Zufall zu sein, daß flache Kurven vor allem bei Tumoren mit hohen s-Zahlen vorkommen, die extremen Gipfel dagegen mehr auf die $\pm$ diploiden Tumoren beschränkt sind. Auch bei normalen Geweben pflegen polyploide Chromosomengarnituren besser gepuffert zu sein als diploide, eine sichere Erklärung für dieses Phänomen steht noch aus, vielleicht sind hochfrequente s-Zellen durch eine besonders vorteilhafte Genkombination ausgezeichnet, die nur schwer übertroffen oder erreicht werden kann.

Das Chromosom

Trotz aller Vielfaltigkeit der Erscheinungen ist das Chromosom doch ein recht einheitlicher Zellbestandteil. Seine Fadenstruktur, untergliedert in im einzelnen noch unbekannte Ordnungen von Untereinheiten, ist Ausdruck der linearen Anordnung der Gene. Das Gen selbst ist nicht mehr die letzte Einheit, sondern unter Umständen in mehrere hundert Loci aufgeteilt. Das lineare Prinzip gilt aber generell und äußert sich z.B. in dem Querscheibenmuster der Riesenchromosomen (von Chironomus Tentans, Clever (1962) (17). Die variablen Auflockerungen der Querscheiben ("Puffs") sind direkte Äußerungen einer umschriebenen genetischen Aktivität, die nach den heutigen Vorstellungen in einer RNS-Synthese mit Prägung eines funktionsspezifischen RNS-Musters besteht. Die "Messenger-RNS" vermittelt die Informationen des DNS-Codes an die Struktur des Cytoplasmas. Wie dieser "Code" der Nucleinsäuren, primär der DNS, beschaffen ist, ist noch nicht im einzelnen klar. Es hängt zusammen mit der Sekundärstruktur der DNS, in der vier typische Basen in ihren Sequenzen die jeweilige Spezifität einer genetisch wirksamen Stelle bestimmen. Die Sekundärstruktur der DNS als Doppel-Helix ist wahrscheinlich die Ursache der Spiralisation aller chromosomalen Einheiten. Euchromatin und Heterochromatin sind nächstliegend durch ihren Spiralisationsgrad unterschieden. Sie bilden andererseits mit den "primären" und "sekundären" Einschnürungen, d.h. mit der Spindelansatzstelle am Centrosom und mit der nucleolenbildenden SAT-Strecke, morphologische Charakteristika, die zusammen mit der Chromosomlänge und mit der Länge der einzelnen Chromosomenarme jedes einzelne Chromosom als ein konstantes Individuum kennzeichnen.

I. Chromosomenzahl und Chromosomengröße

Die Chromosomen sind im tätigen Kern, (= "Ruhekern", d.h. nichtmitotischer Kern), nicht erkennbar, was auf ihre starke Hydratation, welche ihre Grenzen unsichtbar macht, bezogen werden kann. Als Individuen sicher abgrenzbar sind sie nur während der mitotischen Kernteilung und auch hier nur in der Metaphase und in der Anaphase, also nur während eines relativ kurzen Zeitraumes. Die Arretierung der Mitosen mit Hilfe des Mitosegiftes Colchicin erfolgt in der Metaphase. In allen Metaphaseplatten eines Individuums liegen - von Sonderfällen abgesehen - immer gleich viele Chromosomen. Dies gilt sogar für Individuen der gleichen Art, und verwandte Arten haben einander ähnelnde Chromosomenzahlen. Man bezeichnet die Somazellen, die jeweils zwei Chromosomensätze enthalten, als diploid, die Keimzellen mit jeweils nur einem Chromosomensatz als haploid. Man nennt die Geschlechtschromosomen (X und Y) Heterosomen gegenüber den jeweils paarweise homologen Autosomen. Im allgemeinen werden Kerne, die mehr als zwei Autosomensätze besitzen, als "polyploid" angesehen.

Man ordnet die Chromosomen nach ihrer Größe. Auf diese Weise ist es möglich zu seriieren und zu beziffern (nach der Denver Konvention beim Menschen): Immer zwei Chromosomen des diploiden Satzes sind genau gleich groß, nur die Geschlechtschromosomen differieren. Um die Größe eines Chromosoms anzugeben, werden in der Regel nicht absolute, sondern relative Maße, meist bezogen auf die Gesamtlänge aller Chromosomen, genannt, da sich die Werte ja infolge verschiedener Präparationen ändern. Alle Chromosomen haben unterschiedliche Größen, und die Chromosomengröße ist der erste Beleg für die Individualität der Chromosomen.

II. Die Einschnürungen

Die Form der meisten Chromosomen ist die eines Stäbchens, dessen Länge variiert, dessen Durchmesser aber innerhalb eines Chromosomensatzes weitgehend konstant ist. Ganz kleine Chromosomen imponieren als kleine Kügelchen mit dem Durchmesser der übrigen Chromosomen.

An der Stelle, an der in der Metaphase die Spindelfasern anheften, haben die Chromosomen eine charakteristische "primäre" Einschnürung. Dort liegt das Centromer. Während der Anaphasewanderung wird die oft schon in der Metaphase vorhandene Abknickung der Chromosomen an dieser Stelle verstärkt, und jedes Chromosom besteht aus zwei Schenkeln oder Armen. Wenn die primäre Einschnürung median liegt, sind beide Arme gleich groß und das Chromosom ist V-förmig. Ist sie nahe an einem Chromosomenende (subterminal), resultieren zwei sehr unterschiedlich lange Schenkel. Der kürzere Arm kann dabei so klein sein, daß man ihn bei der üblichen Präparation gar nicht sieht, und die Spindelansatzstelle (= "Insertion") erscheint terminal. Chromosomen mit echten terminalen Insertionen werden als telocentrisch bezeichnet.

Das Verhältnis des langen zum kurzen Schenkel wird als Armindex errechnet und kennzeichnet neben der Gesamtgröße jedes einzelne Chromosom.

Ein drittes fast ebenso konstantes Individualitätscharakteristikum bilden die "sekundären" Einschnürungen. Man versteht darunter prinzipiell alle diejenigen Einschnürungen, die kein Centromer enthalten. Heitz (1931) (57) nannte diese Chromosomen "SAT"-Chromosomen (sine acido thymonucleinico), da er an dieser Stelle färberisch keine DNS (Thymonucleinsäure) nachweisen konnte. Die relative DNS-Armut der SAT-Strecke ist möglicherweise nur Ausdruck einer besonderen Dehnung, d.h. einer besonders lockeren Spiralisation. Damit stimmt gut überein, daß die SAT-Strecke oft gar keine richtige Einschnürung ist, sondern nur eine weniger kompakte Stelle mit gleichem Durchmesser wie das übrige Chromosom. (Stewart und Bamfort 1942, Therman-Suomalainen 1949) (127, 130).

Ausmessungen von Chromosomensätzen und Vergleiche der relativen Chromosomenlänge und des Armindex führen, neben der Paarung der homologen Chromosomen, zu differenzierten cytologischen Analysen. Es müssen dabei aber die durch relativ häufig auftretenden Fehlerquellen, meist durch Präparationsmethoden bedingt, berücksichtigt werden. Ebenso, wie beim Auszählen von Metaphaseplatten trotz guter Präparation Zählfehler zu berücksichtigen sind. Es muß im allgemeinen bei cytologischen Analysen mit einer Fehlerfrequenz von $\pm 10\%$ gerechnet werden.

III. Das normale Ratten-, Maus- und Hamstergenom

Beim normalen Rattengenom, von Makino und Hsu (1954) (98), Yoshida (1955) (148) und Tjio und Levan (1956) (135) untersucht, beträgt die Chromosomenzahl $2n = 42$. Es können alle drei Chromosomentypen, telo-, meta- und submetacentrische, unterschieden werden. Die Zuteilung zu den drei Gruppen variiert aber von Autor zu Autor.

Das Chromosomenkomplement der Maus, von vielen Cytologen untersucht, aber besonders von Tjio und Levan (1954) (133) definiert, besitzt den Chromosomensatz $2n = 40$. Die Chromosomen sind stets telocentrisch, nur einige der mittleren Größenklasse zeigen ein proximal schwächer gefärbtes, sehr kurzes Segment. Eine paarweise Gruppierung ist nicht möglich.

Die Chromosomengarnitur des Hamsters, mit der Chromosomenzahl $2n = 22$, setzt sich vorwiegend aus metacentrischen, aber auch submetacentrischen und telocentrischen Chromosomen zusammen, die paarweise geordnet werden können.

Material und Methodik

Die Untersuchungen werden am Walker-Carcinom der Ratte durchgeführt. Es handelt sich dabei um ein im Jahre 1928 spontan aufgetretenes Mamma-Carcinom der Ratte, das von Walker gewonnen und seither in zahlreichen Unterlinien unter verschiedenen Bedingungen gehalten und überimpft wird. Es werden 2 verschiedene Stämme des Walker-Carcinoms verwendet, die sich deutlich in ihrer Ploidiestufe unterscheiden. Es ist beschrieben, (Wrba und Rabes 1963) (143), daß spontane und induzierte Wandlungen die Reaktionsweise, die Biochemie und das biologische Verhalten einer Geschwulst, die in Transplantationen gehalten wird, kontinuierlich verändern. Daher ist es sinnlos, eine bestimmt benannte Tumورlinie, in diesem Fall das "Walker-Carcinom", anzugeben, sondern die zu untersuchende Geschwulst-art muß von Fall zu Fall nach ihren biologischen und morphologischen Kennzeichen definiert werden, um eine sichere Ausgangsbasis für die nun erfolgenden Experimente (z.B. Heterotransplantationen) und deren Versuchsergebnisse zu erlangen. Es hat sich erwiesen, daß dazu zu untersuchende Impftumoren erst über 10 Passagen einheitlich gewachsen sein müssen, um übereinstimmende biologische Merkmale zu liefern.

Bei den hier vorliegenden Walker-Carcinomstämmen handelt es sich einmal um das Walker-Carcinom der Ratte in Ascitesform vom Stamm W, zum anderen um den Stamm des Walker-Carcinoms der Ratte, der als Dauerkultur im Institut für experimentelle Krebsforschung der Universität Heidelberg gehalten wird.

Das Walker-Carcinom vom Stamm W entspricht dem inzwischen ausgestorbenen Stamm MR-RM, der 1960 in Ascitesform gewonnen und auf Ratten und Mäusen gehalten wurde. Die Dytologie und Wachstumsbedingungen dieses Ascitestumors wurden eingehend analysiert und beschrieben (Wrba und Ripoll-Gómez 1960) (144).

Während unserer Untersuchungen befindet sich der Tumor auf der 120. bis 130. Passage auf Sprague-Dawley-Ratten (= W). Für die Überimpfung werden vorwiegend weibliche Ratten mit einem Gewicht zwischen 200 bis 370 g verwendet. Das Walker-Carcinom, auf Mäuse, von der NMRI-Linie stammend, intraperitoneal injiziert, (= MW), wächst zur Zeit der Untersuchungen in der 40. bis 50. Passage. Es werden sowohl weibliche als auch männliche Tiere mit einem Gewicht zwischen 18 bis 40 g verwendet. Die entsprechende Linie auf Goldhamster (= GW) beiderlei Geschlechts mit einem Gewicht zwischen 56 bis 117 g transplantiert, befindet sich zur Zeit der Untersuchungen in über 50 Passagen. Diese heterologen Tumorstämme sind ohne Vorbehandlung der Trägartiere entstanden (Wrba und Ripoll-Gómez 1960) (145).

Das aus Heidelberg stammende Walker-Carcinom der Ratte wird seit mehreren Jahren in-vitro als Suspensionskultur in Vierkantflaschen

gehalten (= WKH). Das Nährmedium setzt sich aus 15 Teilen Hühner-Embryonal-Extrakt, 40 Teilen Kälber-Serum und 45 Teilen Salzlösung Hanks zusammen. In vivo wird der Geschwulststamm durch intraperitoneale Implantation von Tumorkulturen bei Ratten gewonnen und in den weiteren Passagen durch Transplantationen von Tumor-Ascites von Tier zu Tier gehalten (= WH). Die Ratten entstammen ebenfalls den Sprague-Dawley-Ratten. Es werden Tiere beider Geschlechter verwendet.

Zur Überimpfung des Tumorstammes werden jeweils 0,5 ml Tumor-Ascites intraperitoneal injiziert. Nach der Entwicklung der Geschwulst wird die Arrestierung der Mitosen durch Verabreichung von jeweils 6 - 25 mg pro kg Körpergewicht Colcemid (Ciba) 3 - 7 Tage nach Transplantation erreicht. Nach einer Einwirkdauer von 3 - 15 Stunden wird die Ascitesflüssigkeit gewonnen. Die Kulturen werden 24 Stunden nach dem letzten Mediumwechsel mit 0,5 - 1,0 mg pro Flasche Colcemid versetzt mit einer Einwirkdauer von 4 Stunden. Die Schwankungsbreite der Dosis beruht auf einer großen Zahl von Mißerfolgen, die es notwendig machten, von Versuch zu Versuch die Dosis zu ändern. Ascites und Kulturen werden in gleicher Weise weiterverarbeitet. Die Zellen werden je nach Beschaffenheit mit Ringerlösung gewaschen, 20 Minuten in einer hypotonischen Lösung (Pannet-Compton : Wasser = 1:4) bei 37° C gequollen und anschließend mit Eisessig-Alkohol (1:3) fixiert. Die so präparierten Zellen werden auf eisgekühlte Objektträger abgetupft, in Orcein (Merck oder Gurr) gefärbt und mit Eukitt eingebettet. Die Auswertung der Präparate erfolgt im Mikrofotogramm. Es werden intakte Mitosezellen fotografiert und ausgewählt, letzteres geschieht bei 3000facher Vergrößerung. Von jeder Tierart werden 10 tumortragende Tiere verarbeitet, ebenfalls die Gewebekulturen in 10 Fällen analysiert. Pro Versuchstier bzw. Gewebekultur kommen 60 - 80 Mitosezellen zur Auswertung. Das Ergebnis eines Versuchs ergibt sich dann im Histogramm, d.h. in einem Koordinatensystem zeigt die Ordinate die Anzahl der Zellen, die Abszisse die Anzahl der Chromosomen pro Zelle an. Aus dem Histogramm ist die modale Chromosomenzahl oder stemline (= s-line) ersichtlich. Weiterhin werden typische Mitosen in Karyogrammen, d.h. paarige Gruppierung der Chromosomen, oder Idiogrammen, d.h. Anordnung der Chromosomen nach Größe, dargestellt.

Versuchsergebnisse

I. Veränderungen des Chromosomensatzes des Walker-Carcinoms (Stamm W) als Folge der Heterotransplantationen auf Ratte, Maus und Hamster

Bei allen 3 Tierarten liegt das Maximum der Chromosomenzahl pro Zelle durchschnittlich bei 63 (60 - 65). Dies geht deutlich aus Tab. 1 hervor, die eine Zusammenfassung der Versuchsergebnisse in Bezug auf ihre numerische Auswertung gibt. Die Zahl entspricht dem triploiden Chromosomensatz der Ratte ($n = 21$). Beim Vergleich der Histogramme wird eine weitgehende Übereinstimmung in der Streuung der Chromosomenzahlen pro Zelle klar (Tab. 2). Aneuploide, d.h. haploide, hypodiploide und hyperdiploide, ganz vereinzelt polyploide Chromosomenzahlen, treten bei allen 3 Tierarten etwa in gleicher Streuung auf. Die Chromosomenzahl dieses Tumors ist auffallend stabil, denn weder Ratte, Maus noch Hamster als Trägartier vermögen eine numerische Variation der Geschwulstzellen zu bewirken. Seine Stammlinie liegt zwischen 60 - 65 Chromosomen, unabhängig von den geänderten Umweltbedingungen durch Heterotransplantation. Vielleicht kommt darin eine gewisse Individualität des Tumors zum Ausdruck.

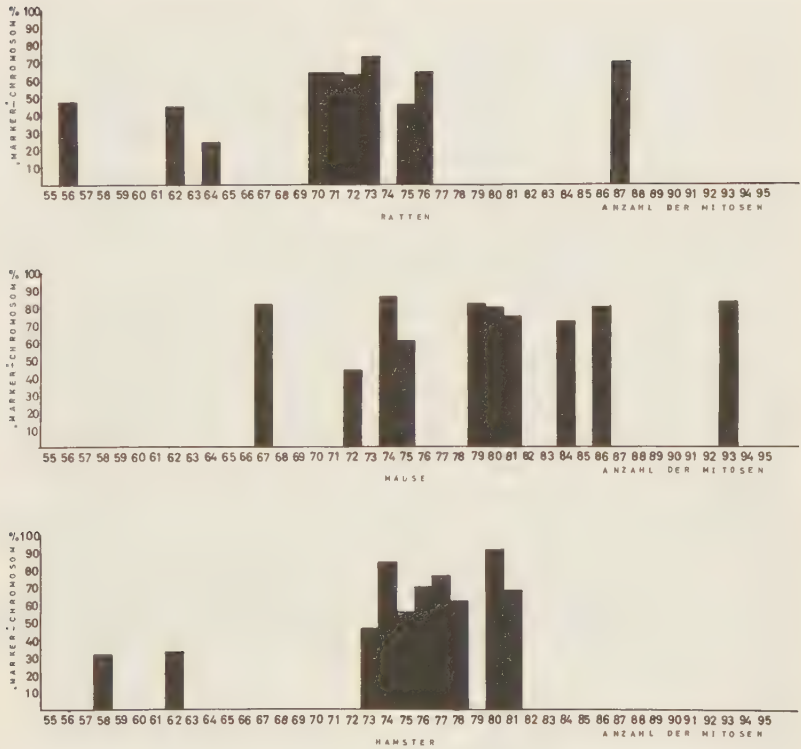
Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Walkertumoren hat das hier untersuchte Walker-Carcinom vom Stamm W in fast allen Zellen ein auffallendes Markierungschromosom. Es erscheint im Rattenascites in 61 % von insgesamt 707 Mitosen, im Mäuseascites in 78 % von 791 ausgezählten Mitosen, im Hamsterascites in 63 % von 732 ausgewerteten Mitosen. Tab. 3 zeigt das prozentuale Auftreten dieses Markierungschromosoms in den untersuchten Fällen. (Vergl. auch Tab. 1, A und B). Interessant ist, daß dieses Chromosom unabhängig von der Chromosomenzahl auftritt, in polyploiden Zellen kann es zum Teil doppelt vorhanden sein.

Es handelt sich bei diesem Markierungschromosom um ein großes submetacentrisches Chromosom mit einer deutlichen heterochromatischen Zone am Centromer (Abb. 1, 2, 3 a und b). Bemerkenswert ist, daß dieses Chromosom nicht nur in den Tumorzellen aller drei Tierarten in gleichmäßiger Prozentzahl auftritt, sondern sogar das Aussehen unabhängig vom Trägartier gleich ist. Hierdurch ist die obenerwähnte Annahme von der Individualität des Tumors wieder gestützt.

Ein weiteres charakteristisches Chromosom, das auch bei dem von Rütishauser 1962 untersuchten Walker-Ca auftritt und als mit-Chromosom ($mt = \text{minute-telocentrics}$) bezeichnet wird, ist gehäuft in den Tumorzellen aller drei Tierarten zu sehen, teilweise sogar 2 - 3 mal in einer Metaphaseplatte. Es handelt sich dabei um ein sehr kleines telocentrisches Chromosom, das eine geringere Größe als das kleinste Chromosom (Y-Chromosom) des normalen Rattenkomplementes auf-

[illegible]

Tab. 1 Verteilung der Tumorzellen des Walker-Carcinoms (Stamm W) bezüglich ihrer Chromosomenzahl nach Heterotransplantation auf Ratten, Mäuse und Hamster.



Tab. 3 Prozentuales Auftreten des submetacentrischen Markierungschromosoms in den untersuchten Ascitestumoren von Ratten, Mäusen und Hamstern.

weist. Wie bei Ruti s h a u s e r e r s c h e i n t e s h i e r d u n k l e r g e f ä r b t u n d k o m p a k t e r a l s d i e ü b r i g e n C h r o m o s o m e n . W i e d e r t r i t t a u c h d i e s e s C h r o m o s o m u n a b h ä n g i g v o n d e r C h r o m o s o m e n z a h l p r o Z e l l e i n a l l e n P l o i d i e - S t u f e n a u c h i n d e n s - Z e l l e n a u f .

Weiter unterbaut wird die Annahme von der Autonomie dieses Tumors durch den Vergleich der Karyogramme einer von Ratte, Maus und Hamster stammenden Tumorzelle mit der modalen Chromosomenzahl (Abb. 1b, 2b, 3b). Am Anfang und Ende der Karyogramme stehen jeweils die charakteristischen Markierungschromosomen. Auffallend ist die gute Übereinstimmung der morphologischen Chromosomenmuster aller 3 Karyogramme unabhängig vom Wirtstier. Es ist interessant, die durchschnittliche Häufung an telo-, meta- und submetacentrischen Chromosomen pro Zelle zu vergleichen. Von jeder Tierart werden jeweils 30 Tumorzellen auf ihre Chromosomentypen hin untersucht. Die telocentrischen Chromosomen überwiegen, es folgen an Zahl die metacentrischen Chromosomen pro Zelle. Wieder besteht hier eine Unabhängigkeit in der Verteilung dieser drei Chromosomentypen vom tumortragenden Tier. Tab. 4 gibt einen Überblick über die durchschnittliche Verteilung der telo-, meta- und submetacentrischen Chromosomen pro Zelle. In Rattenzellen ist die Durchschnittszahl der telocentrischen Chromosomen zwischen 27 - 28, der metacentrischen zwischen 23 - 24, die der submetacentrischen zwischen 9 - 11. Bei Mäusen zeigen die Zellen eine Durchschnittszahl der telocentrischen Chromosomen zwischen 25 - 26, der metacentrischen zwischen 24 - 25, der submetacentrischen von 9 - 11 Chromosomen pro Zelle. Diese kleinen Abweichungen dürften wegen der relativ geringen Zellzahl (30 Zellen), die zur Untersuchung kamen, in Relation zur Gesamtzahl an untersuchten Zellen von 2230 auftreten. Bei auf Goldhamstern gewachsenen Tumorzellen liegt der Anteil an telocentrischen Chromosomen zwischen 25 - 29, der metacentrischen zwischen 23 - 24 und der submetacentrischen zwischen 9 - 11 pro Zelle.

Gesamtzahl der untersuchten Zellen		Durchschnittszahl der telocentrischen Chromosomen	Durchschnittszahl der metacentrischen Chromosomen	Durchschnittszahl der submetacentrischen Chromosomen
Ratten	1	10	27	23
	2	10	28	24
	3	10	28	23
Mäuse	1	10	25	24
	2	10	26	24
	3	10	26	25
Hamster	1	10	29	24
	2	10	25	23
	3	10	27	24

Tab. 4 Durchschnittliche Verteilung der Chromosomentypen von Ratten, Mäusen und Hamstern entnommenen Walker-Carcinomzellen.

II. Veränderungen des Chromosomensatzes des Walker-Carcinoms (Heidelberger Stamm) als Folge der Reimplantation eines in vitro gehaltenen Stammes in das Tier. (Hier Ratte.)

Bei der Analyse der Walker-Ca-Zellen aus Kulturen tritt eine Häufung der Chromosomenzahlen zwischen 73 - 80 auf. Tab. 5 stellt die numerische Auswertung der Untersuchungen dar. Am häufigsten liegt die s-Zahl bei 77, jedoch sieht man eine konstante Streuung zwischen 73 - 78 Chromosomen pro Mitosezelle. Dies entspricht dem angenäherten hypotetraploiden Chromosomensatz der Ratte ($n = 21$). Im Vergleich dazu ergibt die numerische Chromosomenauswertung des Ascitestumors, also des von der Kultur ins Tier implantierten Tumors, schon in den ersten Passagen ein zweites deutliches Maximum, das im Bereich des diploiden Chromosomensatzes der Ratte liegt, bei 39 - 42. Daneben existiert ein Maximum zwischen 73 - 80 Chromosomen. Somit sind Zellen mit einem annähernd diploiden und einem hypotetraploiden Chromosomensatz gleichzeitig in einem Tumor enthalten. Die beiden Maxima liegen meist in gleicher Höhe, im Einzelfall überwiegt das eine oder das andere. Sehr deutlich zeigt das auch die kombinierte Darstellung im Histogramm von einem aus der Kultur und einem von der Ratte stammenden Tumor (Tab. 6).

Die relative Steuung beim Tier ist natürlich wesentlich größer. Polyploide Zellen sind etwa in gleicher Anzahl beim Kultur- und Ascitestumor vorhanden (Abb. 8).

Chromosomenmorphologisch können zwischen den in vitro gehaltenen und den von der Ratte stammenden Tumorzellen dieses Stammes keine wesentlichen Änderungen festgestellt werden. Im Vergleich der Idiogramme bzw. der beiden Versuchsreihen in Bezug auf die Zellen mit einer Stammlinie zwischen 73 - 80 Chromosomen können makrostrukturell keine Unterschiede festgestellt werden (Abb. 4 und 5). Auch bei der Untersuchung dieser Zellen auf ihre Chromosomentypen - es werden wieder 30 Tumorzellen auf ihren Durchschnittsanteil an telo-, meta- und submetacentrischen Chromosomen hin ausgewertet - ergibt sich keine Abweichung zwischen den in vitro gehaltenen und den ins Tier implantierten Tumorzellen. Auch hier, wie beim Walker-Ca der Ratte vom Stamm W, findet sich ein Überwiegen der telocentrischen Chromosomen, gefolgt von den metacentrischen, während die Häufigkeit der submetacentrischen Chromosomen, wie beim zuerst untersuchten Walker-Stamm (W), wesentlich geringer ist. Tab. 7 zeigt die durchschnittliche Häufung der telo-, meta- und submetacentrischen Chromosomen von jeweils 30 Mitosezellen des Ascites- und Kulturtumors. Auffällig ist das Auftreten der großen metacentrischen Chromosomen, die praktisch in jeder Zelle nachzuweisen sind und ebenfalls in Walker-Ascites-Carcinom-Zellen vom Stamm W häufig anzutreffen sind. Auch in den von Rutishauser (116) und Busch (12) beschriebenen Walker-Stämmen ist auf dieses Chromosom hingewiesen; vielleicht könnte es als "typisch" für das Walker-Carcinom ganz allein angesehen werden.



Tab. 6 Kombinierte Darstellung der Ergebnisse eines in einer Gewebekultur und eines in einer Ratte gewachsenen Tumors im Histogramm.

Gesamtzahl der untersuchten Zellen		Durchschnittszahl der telocentrischen Chromosomen	Durchschnittszahl der metacentrischen Chromosomen	Durchschnittszahl der submetacentrischen Chromosomen
Tier	1	10	29	25
	2	10	22	19
	3	10	27	22
				9
				8
				10
Kultur	1	10	27	20
	2	10	27	25
	3	10	29	26
				9
				9
				8

Tab. 7 Durchschnittliche Verteilung der Chromosomentypen von Walker-Carcinomzellen einmal vom Tier (Ratte), zum anderen aus der Kultur stammend.

Im Vergleich eines Idiogramms einer Zelle mit dem Chromosomensatz zwischen 73 - 80 (Abb. 5) mit dem Karyogramm einer Mitosezelle von 42 Chromosomen (Abb. 6), beide dem Ascitestumor entstammend, zeigt sich keine Ähnlichkeit in den Chromosomen. Dagegen sieht man bei der Gegenüberstellung von Karyogrammen mit 42 Chromosomen eine fast völlige Übereinstimmung der Chromosomenstruktur. Man könnte diese Zellen eher mit dem normalen Rattengenom vergleichen (Abb. 7).

Diskussion

Beide hier untersuchten Walker-Carcinom-Stämme zeigen als Folge der Änderung der Umweltbedingungen cytogenetische Verschiebungen innerhalb ihrer Zellpopulationen. Die Heterotransplantation, d. h. die Überführung einer mit ihren Eigenschaften an einen bestimmten Wirt adaptierten Geschwulst auf artfremde Wirte, wie auch die Reimplantation von seit Jahren an die in vitro herrschenden Milieubedingungen gewöhnten Zellen in Ratten (zwar dem Ursprungstier der Geschwulst artgleichen Tiere), sind als Mechanismen anzusehen, die Selektionierungen von Tumorzellen mit ganz bestimmten Eigenschaften induzieren. Beim Walker-Ascites-Carcinom vom Stamm W zeigt sich die Veränderung vor allem durch das Auftreten des submetacentrischen Markierungschromosoms bei gleichbleibendem Chromosomensatz gegenüber dem Ursprungstumor. Das Walker-Carcinom vom Heidelberger Stamm erfährt eine Verschiebung der modalen Chromosomzahl. Neben der ursprünglichen hypotetraploiden s-Zahl von 73 - 80 wird eine zweite, annähernd diploide Stammlinie mit 39 - 42 Chromosomen deutlich. Stern (126) macht, allerdings im Zusammenhang mit Untersuchungen an menschlichen Chromosomen, folgende interessante Feststellung: "Die Hauptkaryotypen jedes Stammes werden von Zellen aufrechterhalten, die als Stammlinie hervortreten. Andere s-Zellen mit unterschiedlichen Karyotypen existieren daneben und werden mit dem Umweltwechsel dominant."

Könnte nicht auch im oben beschriebenen Versuch das Hervortreten der zweiten Stammlinie als Ausdruck der Selektionierung an Zellen, die bereits die Tendenz, den Karyotyp einer Geschwulst zu bilden, besitzen, aber infolge der gegebenen Umweltbedingungen unterdrückt wurden, angesehen werden? Das Milieu des Peritonealraumes scheint für Zellen dieses Tumors mit 42 (39 - 42) Chromosomen ideale Wachstumsbedingungen zu liefern, was auch darin zum Ausdruck kommt, daß sie sofort, also schon in der ersten Passage dominant werden.

Die Ergebnisse beider Versuchsreihen und die Erkenntnis, daß infolge Umweltveränderungen Selektionsprozesse stattgefunden haben, setzt voraus, einen Tumor als eine Mischung von Einzelzellen mit unterschiedlichen Eigenschaften anzusehen, die sich z. B. in verschiedenen Chromosomenzahlen zeigen.

In diesem Zusammenhang ist es erforderlich, kurz die Mechanismen der numerischen und strukturellen Variationen der Chromosomengarnitur, die sich ja laufend innerhalb eines transplantablen Tumors abspielen und dessen außerordentliche cytogenetische Vielseitigkeit bedingen, zu erwähnen. Sie stellen das "Rohmaterial" für den Ausleseprozeß dar, an dem die Milieufaktoren angreifen können.

Für die zahlenmäßigen Veränderungen, besonders für die Polyploidisierung, sind verschiedene Mechanismen bekannt. Tjio und Levan

(1954) (133) beobachteten in ihren Versuchen vorwiegend sog. C-Mitosen, die auf dem Wege der Restitutionskernbildung zur Entstehung von polyploiden Zellen führen. Sie sind an der Verkürzung der Chromosomen, ihrer zerstreuten Anordnung über die Zelle oder durch andere Verteilungsanomalien zu erkennen. Der in der Krebsforschung verbreitetste Polyploidisierungsmechanismus scheint die Endomitose zu sein. Geitler (1953) (40) konnte den Ablauf einer Endomitose im Interphasekern beobachten. Sie ist dadurch gekennzeichnet, daß auf die Verdopplung der Chromosomen in der Interphase keine Verteilung auf zwei Tochterkerne erfolgt. Folgt nun eine Mitose mit Spindelbildung, so wird sie mit der doppelten Chromosomenzahl durchgeführt, sie treten als Diplo- oder nach zwei aufeinanderfolgenden Endomitosen als Quadruplochromosomen auf. Wir haben bei eigenen Untersuchungen am Hepatom der Ratte typische Bilder solcher Chromosomenkonfigurationen beobachtet (147), Levan und Hauschka (1953) (91) glauben, daß ein anderer Mechanismus für das Entstehen dieser Chromosomenbilder verantwortlich zu machen ist, der allerdings das gleiche Endergebnis wie die Endomitose zeigt, und sprechen von sog. Endoreduplikation. Im Gegensatz zu den Endomitosen läßt sich der Verdopplungsvorgang im Interphasekern einer Endoreduplikation nicht nachweisen, so daß er erst in der der Endoreduplikation folgenden Mitose durch das Auftreten von Diplo- bzw. Quadruplochromosomen zu erkennen ist. Ihre Trennung in Chromosomen und Chromatiden erfolgt vor der Metaphase und in der Anaphase. Endomitose und Endoreduplikation können nebeneinander vorkommen. Während das Vorkommen polyploider oder $2s$ -Zellen neben s -Zellen innerhalb desselben Tumors durch den Nachweis der eben erwähnten Mechanismen erklärt werden kann, bereitet der Befund, daß bei ein und demselben Tumor verschiedene aneuploide s -Zahlen und zusätzlich aneuploide Plus- und Minusabweicher existieren, der Erklärung größere Schwierigkeiten. Besonders das Entstehen von $3x$ -Zahlen und $5x$ -Zahlen ist noch nicht einwandfrei nachgewiesen. Das Auftreten von aneuploiden s -Zahlen soll über den Umweg von Tetraploidie erreicht werden. Die Chromosomenzahl eines $\pm$ diploiden Tumors wird zuerst durch Endomitose oder Endoreduplikation verdoppelt und dann durch einen Reduktionsvorgang auf eine niedrigere heteroploide Zahl zurückgeführt. Als solcher könnten z.B. multipolare Spindeln in Frage kommen, die von Tirmonen und Therman (1950) (132) in Tumorzellen häufig beobachtet werden. Da aber offensichtlich nicht jede heteroploide Chromosomenzahl gegenüber den s - und $2s$ -Zahlen des betroffenen Tumors konkurrenzfähig ist, wie die relative Konstanz der s -Zahl (z.B. bei dem beschriebenen Heterotransplantationsversuch) beweist, muß dieser Vorgang sehr oft wiederholt werden, bis sich das Tumorstadium um eine neue heteroploide s -Zahl stabilisieren kann. Ob die Anzahl multipolarer Spindeln dazu ausreicht? Ein weiterer Mechanismus für die Entstehung heteroploider s -Zellen wird von Gläss (1956, 1957) (41, 42) diskutiert. Er spricht von Genomsonderung, womit er die innerhalb einer Metaphase auftretende lagemäßige Gruppierung bzw. Sonderung von homologen Chromosomensätzen bezeichnet. Dieses Phänomen wurde in allen Ploidiegraden gefunden. Genom-

sonderung polyploider Zellen müßte u.a. zur Entstehung haploider, triploider und pentaploider Zellen führen. Daß der triploide Chromosomensatz des oben beschriebenen Walker-Ascites-Carcinoms vom Stamm W einmal auf diesem Weg entstanden ist, ist nicht anzunehmen, da der Versuch, die Chromosomen in Dreiergruppen zu ordnen, nicht durchzuführen ist. Abb. 1b, 2b, 3b zeigen deutlich, daß drei mehr oder weniger komplette Chromosomensätze, wie sie bei Genomsonderung entstehen müßten, nicht vorhanden sind. Auch ein umgekehrter Vorgang, Verschmelzung von Genomen zweier Zellen durch Zellfusion, könnte zur numerischen Variation neoplastischer Zellen beitragen. (Lederberg, 1958) (82). Das nicht seltene Vorkommen zweikerniger Zellen spricht für diese Annahme. Multipolare Spindeln, Genomsonderung und Zellfusion dürften in der Regel drastische Änderungen in der Chromosomenzahl der Tumorzellen zur Folge haben. Daß neben diesen Mechanismen auch solche bestehen, die zum Verlust oder Gewinn nur einzelner Chromosomen führen, geht aus der strukturellen Analyse von Tumorzellen, speziell aus der Untersuchung über die Häufigkeit und Verteilung der Markierungschromosomen, hervor. In Hinblick z.B. auf das bei Heterotransplantation des Walker-Carcinoms vom Stamm W entstandene und von vornherein beim Heidelberger Stamm zu beobachtende mt-Chromosom, findet man dieses teilweise nicht, teilweise zwei- bzw. dreimal in einer Zelle. Als wahrscheinlicher Mechanismus für diese Verteilung könnte somatische Non-disjunction, eine Verteilungsstörung der Chromosomen in der Anaphase, die auch wiederholt auftreten kann, wie es das Vorkommen von Zellen mit 3 mt-Chromosomen zeigt, in Betracht kommen. Möglicherweise ist aber auch das Liegenbleiben von Chromosomen in der Anaphase für diesen Vorgang verantwortlich. Obschon das Verhältnis der Plus- und Minusvarianten meist zu Gunsten letzterer verschoben ist, scheint somatische Non-disjunction eventuell mit der Mitosestörung, d.h. dem Liegenbleiben einzelner Chromosomen, kombiniert, wenigstens teilweise für die aneuploide Variation verantwortlich zu sein. Außerdem besteht natürlich die Möglichkeit der Chromosomenverschmelzung, wie sie Hansen-Melander (1958) (50) für das Entstehen von metacentrischen Chromosomen in Mäusetumoren (normalerweise besteht ein Mäusegenom nur aus telocentrischen Chromosomen) angibt: zwei telocentrische Chromosomen lagern sich an ihren terminalen Enden aneinander. Typische Bilder solcher Chromosomenaberrationen konnten wir auch bei unseren Versuchen am Hepatom der Ratte beobachten.

Als Mechanismen struktureller Veränderungen, die ihrerseits weiter zur Umwandlung des Karyotyps maligner Zellen führen, kommen natürlich vor allem Chromosomenbrüche und Wiedervereinigung in Betracht. Levan (86) weist auf Brückenbildungen in der Anaphase hin, welche auf die Entstehung dicentrischer Chromosomen hinweisen. Bei der riesigen Anzahl von Zellen, aus denen ein Tumor zusammengesetzt ist, braucht es nur eine geringe Bruch- und Wiedervereinigungsfrequenz, damit eine strukturelle Veränderung eines Chromosomenkomplexes erreicht werden kann. Levan (1956 a, c) (86, 88) bezieht die Entstehung von kryptostrukturellen Variationen besonders auf Trans-

lokation. - Zum Ursprung des beim Walker-Cardinom (Stamm W) nach Heterotransplantation gefundenen Markierungschromosoms können keine begründeten Angaben gemacht werden. Es ist kaum anzunehmen, daß es sich hierbei um Chromosomenbrüche mit nachfolgender Vereinigung der Bruchstücke zweier Chromosomen handelt. Dagegen spricht vor allem das Auftreten der fast immer vollständig "ungefärbten Zone" zwischen Centromer und dem heterochromatischen Bereich. Diese macht die Möglichkeit, daß es ursprünglich ein großer submetacentrisches Chromosom war, das durch Aufhellung einer metacentrischen Region das typische Aussehen bekommen hat, zunichte. Eher wäre an einen anderen Vorgang, nämlich das Zusammenlagern eines telocentrischen mit einem metacentrischen Chromosom, zu denken. Es müßte sich dabei um zwei Chromosomen handeln, die von vornherein die Tendenz haben, sich anzulagern und deren gegenseitige Anziehungsmechanismen eventuell durch das heterologe Wachstum verstärkt werden, sodaß demzufolge eine Zusammenlagerung erfolgen könnte. Etwas unterstützt wird diese Annahme dadurch, daß es einerseits teilweise schwerfällt zu entscheiden, ob es sich um ein oder zwei Chromosomen handelt, andererseits infolge vergleichender Betrachtungen es als ein Chromosom angesehen werden muß, woraus man schließen könnte, jeweils verschieden weite Stadien der Anlagerung zu sehen. Was die Entstehung des heterochromatischen Segmentes betrifft, müßte dieses Folge oder eventuell Voraussetzung für das Zusammenkommen der beiden Chromosomen sein. Für letzteres spricht, daß nicht selten in Zellen Chromosomen gesehen werden, deren Aussehen man als "Vorstadien" bezeichnen könnte. Es handelt sich dabei um metacentrische Chromosomen, deren einer Schenkel aufgehellt erscheint und um telocentrische Chromosomen, die sich an ihrem Centromer leicht zu öffnen beginnen. Es könnten dies natürlich auch Folgen der Präparation sein. Wie Darlington und Shaw (1959) (20) für eine Reihe von Untersuchungen an Pflanzenchromosomen (Trillium) mit heterochromatischer Zone gezeigt haben, können sich H-Segmente durch Reduplikation kleinster interkalärer, heterochromatischer Regionen vergrößern und so sichtbar werden. Vielleicht läßt sich das Entstehen des heterochromatischen Segmentes in oben beschriebenem Markierungschromosom auf dieser Basis verstehen. Die hier beschriebenen Mechanismen, die für das Auftreten des charakteristischen Markierungschromosoms im Stamm W des Walker-Ascites-Carcinoms verantwortlich sein könnten, sind nicht bewiesen, sie können nur angenommen werden.

Möglicherweise handelt es sich bei dieser heterochromatischen Zone um einen Bezirk, in dem keine DNS (Thymonucleinsäure) nachzuweisen ist, demnach also genetisch inaktiv ist, wie es Heitz (57) für die sekundären Einschnürungen bei den sogenannten SAT-Chromosomen beschreibt.

Um kurz auf das Zustandekommen der großen metacentrischen Chromosomen, die ja sowohl im Stamm W als auch im Heidelberger Stamm des Walker-Carcinoms auftreten, einzugehen, könnte angenommen

werden, daß sie infolge des oben beschriebenen Mechanismus der Chromosomenaberration entstanden sind. Andererseits ist die Möglichkeit von erfolgten Chromosomenbrüchen mit anschließendem Zusammenlagern der Bruchstücke nicht auszuschließen. Verbindet man mit ihrem Auftreten das Entstehen der mt-Chromosomen, die auch im Heidelberger Stamm fast in jeder Zelle, sowohl im Kultur- als auch im Ascitestumor nachzuweisen sind, so könnte man diese beiden Ereignisse in einen Zusammenhang bringen. Durch Bruch akrocentrischer Chromosomen am kurzen bzw. langen Arm und darauffolgender Translokation der ungleichen acentrischen Fragmente kommt es zur Bildung metacentrischer und mt-Chromosomen. Der Mechanismus, der die häufig unregelmäßige Verteilung letzterer bewirken könnte, ist oben beschrieben.

Es ist denkbar, daß unter dem Einfluß wechselnder Milieubedingungen nicht nur die Selektion bereits vorhandener, aber bisher nicht hervortretender, oder neuer Zelltypen gefördert wird, sondern daß davon auch ein Anstoß zu erhöhter Mutabilität ausgeht und die Bildung neuer Variationsmuster bedingt. Daß solche Chromosomenmutationen in Transplantationen vorkommen können, ist oben beschrieben. Besonders *Levan* und Mitarbeiter haben nachgewiesen, daß sich verschiedene Tumortalinien nicht nur in der s-Zahl und im Vorkommen oder Fehlen von Markierungschromosomen, sondern auch in mannigfaltigen kryptostrukturellen Abweichungen unterscheiden. Das gilt besonders für tetraploide Tumortalinien. *Levan* (1956 a, c) (86, 88) betont, daß die Herausbildung einer neuen stemline nicht allein durch Verlust oder Gewinn von Chromosomen erreicht werden kann, sondern dazu noch zahlreiche intra- und interchromosomale Translokationen notwendig sind. Es liegt nahe, anzunehmen, daß solche mutativen Vorgänge durch heterologes Wachstum bzw. überhaupt geänderte Umweltbedingungen zunehmen. Wie *Levan* und *Biesele* (1958) (90) nachgewiesen haben, kommen Chromosomenmutationen, Verlust und Gewinn von Chromosomen durch somatische Non-disjunction und Entstehung neuer Chromosomenstrukturen durch Chromosomenbrüche und Wiedervereinigung in Gewebekulturen recht häufig vor. Obschon sich innerhalb eines Tumors laufend die oben beschriebenen Prozesse abspielen, die heterogene Zellpopulationen bedingen und durch zusätzliche Milieuveränderungen gefördert werden, stellen sich doch oft scheinbar recht stabile Gleichgewichte ein, die nur schwer auf die Dauer gestört werden können. Vielleicht ist darin eine Art Individualität von Tumoren zu sehen. *Yoshida* (1957) bespricht zum ersten Mal den Begriff der "cellulären Autonomie" von malignen Geschwülsten, begründet auf die Erfahrungen, die durch die Studien am Ascites-Hepatom, gewonnen wurden. Weiter wurde die Annahme der "cellulären Autonomie" unterstützt durch Untersuchungen am *Yoshida-Sarkom*, das unter keinen Umständen auf Goldhamstern zur Entwicklung zu bringen war. (*Wrbka* und *Ripoll-Gómez*, 1960) (145). Hinsichtlich des untersuchten Walker-Ascites-Carcinoms vom Stamm *W* ist bereits auf die Kriterien, die für die Individualität dieser Geschwulst sprechen, eingegangen worden. Die unabhängig von der Trägartierart erhalten bleibende mo-

dale Chromosomenzahl, das in allen drei Tierarten in annähernd gleicher Prozentzahl auftretende submetacentrische Markierungschromosom (Tab. 3), welches sich zu dem nicht einmal in seinem Aussehen verändert, auch das vom jeweiligen Wirt unbeeinflusst bleibende makrostrukturelle Chromosomenmuster, deutlich beim Vergleich der Karyogramme zu sehen (Abb. 1b, 2b, 3b), zeigen die Fähigkeit dieses Geschwulststammes zu autonomem Wachstum.

Inwieweit führt nun die heterologe Transplantation bzw. allgemein ein Milieuwechsel zu Veränderungen in der Virulenz eines Tumors, oder um auf die Definition von Ehrlich (28) einzugehen, der das Tumorstadium als "Produkt aus Tumorigenität und Tierresistenz" ansieht, wieweit kommt es zu Änderungen dieses Produktes? Wie bereits mehrmals erwähnt, führen Milieuänderungen zu Selektionierung derjenigen Zellen, die befähigt sind, unter den neu gegebenen Bedingungen zu wachsen. Bezüglich des Walker-Carcinom vom Heidelberger Stamm ist zu beobachten, daß bei Überführung von Tumorzellen aus der Kultur ins Tier sich innerhalb des ersten und zweiten Tages große Mengen von Ascitesflüssigkeit bilden und zu diesem Zeitpunkt eine optimale Auswertung des Tumors für Chromosomenanalysen gegeben ist, sich aber in nahezu allen Fällen am dritten Tag nach Beimpfung die entstandene Geschwulstmenge innerhalb weniger Stunden zurückbildet. Auch ist eine cytologische Analyse in dieser Zeit nicht möglich, da bei Präparation keine Mitosen mehr zu finden sind. Man könnte hierin eine Auseinandersetzung zwischen Tumorigenität in den ersten Tagen und in der später vom Tier ausgehenden aktivierten Abwehrkraft sehen. Es scheint, daß die Zellen durch das über Jahre hinaus gewohnte Leben in vitro, in ihrer Virulenz so geschwächt sind, daß sie den Umweltbedingungen, wie sie im Peritonealraum der Ratte herrschen, nicht mehr gewachsen sind, d. h. die vom Tier ausgehende Resistenz überwiegt. Dieses würde mit den Ergebnissen von Sanford und Mitarbeitern (1956) (121) übereinstimmen, die bei Rücktransplantation eines über zehn Jahre in vitro gehaltenen Mäusestammes ebenfalls eine deutliche Verminderung der carcinogenen Tätigkeit der Tumorzellen feststellen.

Beim Walker-Carcinom vom Stamm W liegen die Verhältnisse von Tumorigenität und Tierresistenz scheinbar umgekehrt. Bei allen drei Tierarten wächst der Tumor in Ascitesform vom ersten Tag nach Implantation, paßt sich also unabhängig vom Wirtstier in gleicher Weise den neuen Umweltbedingungen an. Vielleicht kann dieses Verhalten die schon besprochene Annahme von der Individualität der Geschwulst noch unterstützen. Das Optimum der Ascitesproduktion liegt zwischen dem dritten und vierten Tag, hier ist auch der günstigste Zeitpunkt für die Gewinnung des Tumors für die cytologischen Untersuchungen gegeben. Die Geschwulstzellen behaupten sich aber bei nicht zum Versuch verwerteten Tieren weiter und führen innerhalb von acht bis zehn Tagen zum Tode der Ratten, Mäuse bzw. Hamster. Damit scheint im Kampf zwischen Tierresistenz und Tumorigenität letztere zu überwiegen.

An dieser Stelle soll auch die Frage, inwieweit ein Tumor von Merk-

malen des Trägartieres seinen individuellen Faktoren, seinen Rassen- und Artmerkmalen beeinflusst oder von Tumorigenität und -eigenschaften geprägt wird, eingegangen werden. Ein typisches Kriterium der Geschwulst, nämlich das Aussehen der Ascitesflüssigkeit, scheint ausschließlich von der Trägartierart her determiniert zu werden (Wrba und Ripoll-Gómez, 1960, Wrba und Rabes, 1963 (144, 143). Es zeigt sich auch bei den Versuchen mit dem Walker-Carcinom beider Stämme, daß die Tumoren in Ascitesform unabhängig von der Ursprungstierart auf Ratten hämorrhagisch wachsen, auf Mäuse heterolog transplantiert ein stark chylöses und auf Hamstern auch leicht hämorrhagisches Aussehen bekommen.

Da die Fähigkeit eines Tumors, auf einer Wirtsrasse zu wachsen, genetisch bedingt ist, muß angenommen werden, daß, wie in Transplantationsversuchen wiederholt beobachtet, der Übergang von spezifischem zu unspezifischem Wachstum mit genetischen Veränderungen, z.B. von Histokompatibilitäts-Antigenen, verbunden ist. Hauschka (1961) (52), Hauschka und Mitarbeiter (1957) (53) und Levan (1956 a, c) (86, 88) sind der Ansicht, daß solche Umwandlungen im Verhalten eines Tumors numerische und strukturelle Voraussetzungen haben könnten: Heteroploide Tumoren sind in der Regel weniger spezifisch als diploide. Das bedeutet, daß die Auffassung, Tumorigenität, eventuell sogar Tumorentstehung, als Effekt der Auslese bestimmter, für das unabhängige Wachstum immer besser angepaßter chromosomaler Variationsmuster anzusehen, wiederum Folge davon ist, daß bei Tumorzellen in den Chromosomen der konzentrierten Erbmasse dieselbe Bedeutung zukommt, wie im normalen Organismus. Obwohl diese Interpretation einleuchtend ist, darf sie nicht als bewiesen gelten. Die beträchtlichen chromosomalen Unterschiede zwischen verschiedenen Tumorkolonien derselben Herkunft sprechen z.B. dafür, daß weder die s-Zahl noch die Markierungschromosomen unerläßliche Voraussetzung für das maligne Wachstum darstellen. Malignes Wachstum ist auch möglich mit Chromosomengarnituren, die so wenig vom normalen Status abweichen, daß die Differenzen in einer großen numerischen und strukturellen Analyse nicht nachgewiesen werden können. Das Tumorigenitätswachstum ist also nicht an eine bestimmte Chromosomengarnitur gebunden, sondern läßt der chromosomalen Variation im Vergleich zum normalen Gewebe einen außerordentlich großen Spielraum offen. Es fragt sich, ob diese Toleranz bezüglich der chromosomalen Variation mit dem unverminderten genetischen Effekt der Chromosomen in Übereinstimmung gebracht werden kann oder ob sie auf eine Herabsetzung der genetischen Wirkung des Chromatins hinweist.

Könnten nicht bei der Herausbildung von Variationsmustern neoplastische Zellen auch andere Faktoren, z.B. Störungen im gegenseitigen Verhältnis von Plasma und Kern, eine Rolle spielen? Darlington und Mather (1949) (19) und Darlington (1948) (18) sehen den Grund einer solchen Relationsstörung in einer nicht vom Kern kontrollierten Determinierung des Plasmas. Eine zweite Möglichkeit, die zur Verschiebung der Kern-Plasma-Relation führen kann, ist die oben erwähn-

te Herabsetzung der genetischen Aktivität der Chromosomen. Zu der letztgenannten Möglichkeit nimmt Schulz (1957) (124) Stellung. Er sagt, daß Tumorzellen neoplastischer Gewebe am ehesten mit heterochromatischen Segmenten normaler Chromosomensätze zu vergleichen sind. Es liegen aber für diese beiden Annahmen keine Beweise vor. Bei der Erklärung erhöhter chromosomaler Mutabilität ist aber die Möglichkeit funktioneller Aberrationen der Chromosomen, z.B. eine herabgesetzte genetische Aktivität, nicht auszuschließen.

Die Bedeutung der großen cytologischen Variabilität von Tumorzellen und ihre Beziehung zur Tumorentstehung und Tumورprogression ist anscheinend bisher nicht abzusehen.

Die Heterogenität innerhalb der Zellpopulation bereitet natürlich dem Versuch, Tumoren mit Hilfe von Chemotherapeutika zu beeinflussen, große Schwierigkeiten.

Ein großer Prozentsatz von Zellen in einer Geschwulst wird durch Substanzen zu vernichten sein, der Rest der Zellen überlebt, höchstwahrscheinlich infolge ihrer natürlichen Resistenz gegen die angewandte Substanz (Wrba und Rabes, 1963) (143). Ein anderer Grund dafür ist wohl in der Anpassungsfähigkeit der Tumorzelle zu suchen, die es ihr ermöglicht, unter vielseitiger und leichter Veränderung ihrer Ausdrucksform und ihres inneren Gefüges ihre Lebensfähigkeit zu erhalten. Das könnte eventuell zur Folge haben, daß aufgrund des angewandten Chemotherapeutikums für eine Anzahl von Zellen günstigere Stoffwechselbedingungen gegeben werden und ein vermehrtes, eventuell andersartiges Wachstum daraus resultiert. Schließlich werden durch die Verabreichung solcher Substanzen die Tumorzellen gezwungen, unter veränderten Umweltbedingungen zu leben, warum soll sich nicht auch hier, wie so häufig experimentell nachgewiesen, ebenfalls eine Virulenzvermehrung ergeben? Daraus ist natürlich der Schluß zu ziehen, daß, sofern nicht auf irgendeine Art und Weise eine gewisse "Gesetzmäßigkeit" im Wachstum für die Zellen innerhalb der Population eines Tumors gefunden, oder eventuell durch äußere Einflüsse erzeugt wird, an die Anwendung von Chemotherapeutika in der Krebsbehandlung kaum zu denken ist; es sei denn, es käme eine Substanz zur Anwendung, die "ein Phänomen" anzugreifen vermag, das bei allen Tumorzellen gleich ist und deren Entstehen, überhaupt ihr Bestehen ermöglicht und zur Ausrottung aller abartigen Zellen führt. Für das Vorhandensein eines solchen "Phänomens" gibt es heute noch keinerlei Anhaltspunkte.

Die in den letzten Jahren energisch vorangetriebenen cytologischen Untersuchungen von Tumorzellen in der Krebsforschung lassen hoffen, daß neue Ergebnisse mehr und mehr Einblicke in die Zusammenhänge von Chromosomenabweichungen und Tumorentstehung bzw. Tumорprogression ermöglichen.

Zusammenfassung

Es wurden zwei verschiedene Stämme des Walker-Carcinoms auf ihre Veränderungen im Chromosomenkomplement infolge wechselnder Umweltbedingungen untersucht.

Es handelte sich dabei einmal um das Walker-Ascites-Carcinom der Ratte vom Stamm W, das ohne Vorbehandlung auf Ratten, Mäuse und Hamster heterotransplantiert wurde. Es ergab, daß bei Übereinstimmung im Chromosomensatz gegenüber der ursprünglichen Geschwulst, ein charakteristisches Markierungschromosom auftrat. Dieses könnte eventuell durch das heterologe Wachstum induziert und als Folge der Heterotransplantation angesehen werden.

Die zweite Versuchsreihe wurde mit einem seit Jahren in vitro gehaltenen Walker-Carcinom durchgeführt. Seine modale Chromosomenzahl liegt zwischen 73 und 80. Bei der Überführung dieses Stammes in den Intrapерitonealraum der Ratte wurde schon in der ersten Passage ein zweites Maximum, das im Bereich des diploiden Chromosomensatzes der Ratte liegt, bei 39 - 42 deutlich. Der drastische Milieuwechsel könnte hier das Dominantwerden einer zweiten, bisher nicht hervorgetretenen, aber vorhandenen Stammlinie bewirkt haben.

Literaturverzeichnis

1. Ahlström, C. G.: Heterologous transplatation of cancer. Zschr. Krebsf. 61, 589-606, 1957.
2. Ahlström, C. G. and U. Ising: Serial transfer of Ehrlich mouse ascites cancer in female hamsters. Exp. Cell Res. 11, 7-17, 1956.
3. Balogh, E. de: Investigations on a new heterologous tumor, "Budapest 1938", successfully propagates in Hungarian white rats. Amer. J. Cancer 39, 45-55, 1940.
4. Bayreuther, K.: Der Chromosomenbestand des Ehrlich Ascites Tumors der Maus. Z. Naturforsch. 7 554-559.
5. Bayreuther, K.: Discussion of chromosome behaviour in tumor cells. In. Cell Physiol. of Neoplasia, 38-47, 1960.
6. Bayreuther, K.: Chromosomes in primary neoplastic growth. Nature 186, 6-9, 1960.
7. Berman, I., C. S. Stuhlberg and F. H. Ruddle: Criteria of malignancy. I. Morphology of Detroit strains of human cells in tissue culture. Trans. N. Y. Acad. Sc. Ser. II 19 (5), 432-434, 1957.
8. Bieseke, J. J. and E. V. Cowdry: Chromosomes changes in epidermal carcinogenesis. J. Nat. Canc. Inst. 4, 373-384, 1943.
9. Bollag, W. und C. Meyer: Heterologe Transplantation von Tumoren. Oncologia 7, 66-77, 1954.
10. Boveri, T. H.: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. Jena, Gustav Fischer, 1912.
11. Bryan, R. A.: Reconsideration of the nature of neoplastic reaction in the light of recent advances in cancer research. J. Nat. Canc. Inst. 24, 221-251, 1960.
12. Bush, H.: An introduction to the biochemistry of the cancer cell. Acad. Press, N. Y., London, 1962.
13. Cailleau, R. and F. Costa: Long-term in vitro culturation of some mouse-ascites-tumors: Ehrlich-ascites-carcinoma. J. Nat. Canc. Inst. 26, 271-281, 1961.
14. Chu, E. and N. Giles: Comparative chromosomal studies on mammalian cells in culture. I. The HeLa strain and its mutant clonal derivatives. J. Nat. Canc. Inst. 20, 383-395, 1958.
15. Chu, E., K. Sanford and W. R. Earle: Comparative chromosomal studies on mammalian cells in culture. II. Mouse

- sarcoma producing. J. Nat. Canc. Inst. 21, 729-751, 1958.
16. Clever, U.: Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von Chironimus Tentans und ihre Beziehungen zur Entwicklung. I. Genaktivierung durch Ectydon. Chromosoma 12, 607 - 675, 1961.
 17. Clever, U.: Genaktivitäten in den Riesenchromosomen von Chironimus Tentans und ihre Beziehung zur Entwicklung. II. Das Verhalten der Puffs des letzten Larvenstadiums und der Puppenhäutung. Chromosoma 13, 385-436, 1962.
 18. Darlington, C. D.: The plasmagene theory of the origin of cancer. Brit. J. Cancer 2, 118-126, 1948.
 19. Darlington, C. D. and K. Mather: Genes, Plants and People. London, 1949.
 20. Darlington, C. D. and G. W. Shaw: Parallel polymorphism in the heterochromatin of Trillium species. Heredity 13, 89-121, 1959.
 21. Dawe, C. J., M. Potter, and J. Leighton: Progressions of a reticulum-cell-sarcoma of the mouse in vivo and in vitro. J. Nat. Canc. Inst. 21, 221-235, 1958.
 22. Demerec, M.: The nature of gene. Am. J. Human Genet. 13, 122-127, 1961.
 23. Eagle, H.: Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 122, 501-504, 1955.
 24. Earle, W. R.: Some morphologic variations of certain cells under controled experimental conditions. Nat. Canc. Inst. Monogr. 7, 213-235, 1962.
 25. Earle, W. R. and A. Nettle ship: Production of malignancy in vitro. V. Results of injections of cultures into mice. J. Nat. Canc. Inst. 4, 213-227, 1943.
 26. Earle, W. R., E. Shelton and E. C. Schilling: Production of malignancy in vitro. XI. Further results from reinjection of in vitro cell strains into strain C3H mice. J. Nat. Canc. Inst. 19, 1105, 1950.
 27. Earle, W. R., J. C. Bryant, E. C. Schilling and V. J. Evans: Growth of cell zuspension in tissue culture. Ann. N. Y. Acad. Sc. 63 (5), 666-680, 1956.
 28. Ehrlich, P.: Experimentelle Carcinomstudien an Mäusen. Arb. Kgl. Inst. Frankfurt a. M., 77-102, 1906.
 29. Eicke, J., M. L. Meiners, und H. Wrba: Veränderungen der Stammlinie von Walker - Carcinomzellen durch Umweltfaktoren. Zschr. Krebsf. 66, 193-195, 1964.
 30. Ely, J. O. and J. H. Gray: Chromosome number of in vitro

- cultured Krebs-2-Carcinoma of mice: the selection property of the vitro culture. *Canc. Res.* 21, 1020-1023, 1961.
31. Felde, A.: Human tumor cells in tissue culture. *Cancer* 8, 845-851, 1955.
 32. Fitzgerald, P. H.: Mitosis in partilly pyknotic HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 24, 584-588, 1961.
 33. Ford, C. E.: Human cytogenetics: Its present place and future possibilities. *Am. J. Human Genet.* 12, 104-107, 1960.
 34. Ford, C. E., P. Jacobs and L. G. Lajtha: Human somatic chromosomes. *Nature* 181, 1565-1568, 1958.
 35. Ford, D. K. and G. Yerganian: Observations on the chromosomes of Chinese hamster cells in tissue culture. *J. Nat. Canc. Inst.* 21, 393-425, 1958.
 36. Ford, D. K., R. Wakonig and G. Yerganian: Further observations on the chromosomes of Chinese hamster cell intissue culture, *J. Nat. Canc. Inst.* 22 (2), 765-798, 1959.
 37. Ford, D. K., Ch. Boguszewski and N. Auersperg: Chinese hamster cell strains in vitro: Spontaneous changes and latent polyoma-virus infection. *J. Nat. Canc. Inst.* 26, 691-706, 1961.
 38. Foulds, L.: The experimental study of tumor progression. *Canc. Res.* 14, 327-337, 1954.
 39. Foulds, L.: The nature history of cancer. *J. Chronic Diseases* 8, 2-37, 1958.
 40. Geitler, L.: Endomitose und endomitotische Polyploidisierung. *Protoplasmatologia* VI, C, 1-89, 1953.
 41. Gläss, E.: Die Identifizierung der Chromosomen im Karyotyp der Rattenleber. *Chromosoma* 7, 655-669, 1956.
 42. Gläss, E.: Das Problem der Genomsonderung in den Mitosen unbehandelter Rattenlebern. *Chromosoma* 8, 468-492, 1957.
 43. Gläss, E.: Aneuploide Chromosomenzahlen in den Mitosen der Leber verschieden alter Ratten. *Chromosoma* 9, 269-285, 1958.
 44. Gläss, E.: Die Genomsonderung in den Mitosen der Rattenleber. *Experientia* 18, 192-196, 1962.
 45. Goldschmidt, R. und A. Fischer: Chromosomenstudien an Carcinomzellen in vitro. *Zsch. Krebsf.* 30, 281-285, 1929.
 46. Gropp, A. und R. Lettré: Über adaptive Veränderungen der morphologischen Eigenschaften eines Mammacarcinoms der Maus. *Zschr. Krebsf.* 62, 616-635, 1959.

47. Grundmann, E.: Allgemeine Cytologie: Eine Einführung in die funktionelle Morphologie der Zelle. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1964.
48. Hamperl, H.: Die Morphologie der Tumoren. In: Handbuch der allg. Pathologie, Bd. VI, Springer-Verlag, 1956.
49. Hansemann, D. v.: Über asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. Virchows Arch. Path. Anat. 119, 299-326, 1890.
50. Hansen-Melander, E.: Accelerated evolution of cancer stemlines following environment changes. Hereditas 44, 471-487, 1952.
51. Hauschka, T. S.: Relationship between chromosome ploidy and histocompatibility in mouse ascites tumors. Canc. Res. 12, 269, 1952.
52. Hauschka, T. S.: The chromosomes in ontogeny and oncogeny. Canc. Res. 21, 957-976, 1961.
53. Hauschka, T. S. and D. B. Amos: Cytogenic aspects of compatibility. Ann. N. Y. Acad. Sc. 69, 561-579, 1957.
54. Hauschka, T. S., S. T. Grinnell, L. Révész and G. Klein: Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vivo. IV. Influence of doubled chromosome number on growth rate and final population size. J. Nat. Canc. Inst. 19, 13-30, 1957.
55. Hauschka, T. S. and A. Levan: Inverse relationship between chromosome ploidy and hostspecificity of sixteen transplantable tumors. Exp. Cell Res. 4, 457-467, 1953.
56. Hauschka, T. S. and A. Levan: Cytologic and functional characterization of single cell clones isolated from the Krebs-2 and Ehrlich ascites tumor. J. Nat. Canc. Inst. 21, 77-135, 1958.
57. Heitz, E.: Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 47, 274-284, 1931.
58. Hilwig, I.: Entwicklung eines Rattensarkoms während 5-jähriger Züchtung in der Gewebekultur. Zschr. Krebsf. 63, 222-231, 1960.
59. Hovare, A. and E. V. Haam: Studies on growth and regression of Ehrlich mouse ascites tumor heterotransplante. Canc. Res. 18, 753-759, 1958.
60. Hsu, T. C.: Mammalian chromosomes in vitro. XIII. Cyclic and directional changes of population structure. J. Nat. Canc. Inst. 25, 1339-1353, 1960.
61. Hsu, T. C. and D. S. Kellog: Mammalian chromosomes in vitro

- XII. Experimental evolution of cell populations. J. Nat. Canc. Inst. 24, 1067-1093, 1960.
62. Hsu, T. C. and O. Klatt: Mammalian chromosomes in vitro. X. Heteroploid transformation in neoplastic cells. J. Nat. Canc. Inst. 22, 313-328, 1959.
63. Hsu, T. C. and D. J. Merchant: Mammalian chromosomes in vitro. XIV. Genotypic replacement in cell populations. J. Nat. Canc. Inst. 26, 1075-1081, 1961.
64. Hsu, T. C. and P. S. Moorhead: Chromosomal anomalies in human neoplasms with special reference to the mechanisms polyploidization and aneuploidization. Ann. N. Y. Acad. Sc. 63, 1083-1094, 1956.
65. Hsu, T. C. and P. S. Moorhead: Mammalian chromosomes in vitro. VII. Heteroploidy in human cell strains. J. Nat. Canc. Inst. 18, 463, 1957.
66. Hsu, T. C., C. M. Pomeret and P. S. Moorhead: Mammalian chromosomes in vitro. VIII. Heteroploid transformation in the human cell strain Mayes. J. Nat. Canc. Inst. 19, 867, 1957.
67. Ishihara, T., G. E. Moore and A. Sandberg: Chromosome constitution of cells in effusion of cancer patients. J. Nat. Canc. Inst. 27, 893-932, 1961.
68. Ising, U.: Chromosomal studies in Ehrlich mouse ascites cancer, after heterologous transplantation through hamsters. Brit. J. Cancer 9, 592-599, 1955.
69. Ising, U.: Chromosomal changes in Ehrlich mouse ascites cancer on repeated transfer through hamsters and rats. Acta Patz. et Microb. Scand. 60, 315-327, 1957.
70. Ising, U.: Effect of heterologous on chromosomes of ascites-tumors. Acta Path. et Microb. Scand. Suppl. 127, 1958.
71. Ising, U.: Chromosomal pattern in some mouse ascites tumors after deep freezing. Exp. Cell Res. 19, 475-488, 1960.
72. Ising, U. and A. Levan: The chromosomes of two highly malignant human tumors. Acta Path. et Microb. Scand. 40, 13-24, 1957.
73. Kaziwara, K.: Derivation of stable polyploid sublines from a hyperdiploid Ehrlich ascites carcinoma. Canc. Res. 14, 795-801, 1954.
74. Klein, E.: Gradual transformation of solid into ascites-tumors. Permanent differences between the original and the transformed sublines. Canc. Res. 14, 482-485, 1954.
75. Klein, E.: Immediate transformation of solid into ascites-tumors. Studies on a mammary carcinoma of an inbred mouse strain. Exp. Cell Res. 8, 213-255, 1955.

76. Klein, G. and E. Klein: The transforamtion of solid trans-plantable mouse carcinoma into an ascites-tumor. *Canc. Res.* 11, 466-469, 1954.
77. Klein, G. and E. Klein: Histocompatibility changes in tumors. *J. Cell. and Compar. Phys.* 52, 125-168, 1958.
78. Koch, E.: Metasenbildung bei Impftumoren. *Zschr. Krebsf.* 48, 495-505, 1939.
79. Koller, P. C.: Cytological variability in human carcinomato-sis. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 63, 793-824, 1956.
80. Koller, P. C.: The genetic complement of cancer. *Cancer* 1, 335-403, 1957.
81. Lederberg, J.: Prospects for a genetics of somatic and tumor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 63, 662-665, 1956.
82. Lederberg, J.: Genetic approaches to somatic cell variation: Summery comment. *J. Cell. and Compar. Phys.* 52, 383-401, 1958.
83. Lettré, H.: Das Yoshida-Sarkom der Ratte. (Nach Arbeiten von T. Yoshida). *Zschr. Krebsf.* 59, 287-297, 1953.
84. Lettré, H.: Eigenschaften von Tumorzellen. *Zschr. Krebsf.* 59, 568-580, 1953.
85. Lettré, H. und A. Schleich: Untersuchungen am Yoshida-Tumor. *Naturwissenschaften* 41, 505, 1954.
86. Levan, A.: The significance of polyploidy for the evolution of mouse tumors. *Exp. Cell Res.* 11, 613-629, 1956 a.
87. Levan, A.: Chromosome studien on some human tumors and tissues of normal origin grown in vivo and in vitro on the Sloan - Kettering Institute. *Cancer* 9, 648, 1956 b.
88. Levan, A.: Chromosomes in cancer tissue. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 63, 774-789, 1956 c.
89. Levan, A.: Self-perpetuating ring chromosomes in two human tumors. *Hereditas* 42, 366-372, 1956 d.
90. Levan, A. and J. J. Bieseke: Role of chromosomes in cancro-genesis as studied in serial tissue culture of mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 71, 1022-1053, 1958.
91. Levan, A. and T. S. Hauschka: Endomitotic reduplication mechanisms in ascites tumors of the mouse. *J. Nat. Canc. Inst.* 14, 1-40, 1953.
92. Levan, A. and T. C. Hsu: The chromosomes of two cell strains from mammary carcinomas of the mouse. *Hereditas* 46, 231-240, 1960.

93. Levan, A. and T. C. Hsu: Repeted endoreduplication in mouse cell. *Hereditas* 47, 69-71, 1961.
94. Liebermann, I. and P. Ove: Isolation and study of mutants from mammalian cells in culture. *Proc. Nat. Acad. Sc.* 45, 867-872, 1959.
95. Löwental, H. und G. Jahn: Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuseascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. *Zschr. Krebsf.* 37, 439-674, 1950.
96. Maini, M. M. and H. F. Stich: Chromosomes of tumor cells. II. Effect of various liver carcinogenes on mitosis of hepatic cells. *J. Nat. Canc. Inst.* 26, 1413-1427, 1961.
97. Makino, S.: A cytological study of the Yoshida-Sarcoma, an ascites tumor of white rats. *Chromosoma* 4, 649-674, 1952.
98. Makino, S. and T. C. Hsu: Mammalian chromosomes in vitro. V. The somatic complement of the Norway *Rattus norvegicus*. *Cytologica* 19, 23-28, 1954.
99. Makino, S. and K. Kano: Cytological studies of tumors. IX. Characteristic chromosome individuality in tumor strain-cells in ascites tumor of rats. *J. Nat. Canc. Inst.* 13, 1213-1234, 1952.
100. Makino, S. and M. Sasaki: Cytological studies of tumors. XXI. A comparative idiogram study of the Yoshida-Sarcoma and its subline derivatives. *J. Nat. Canc. Inst.* 20, 465-488, 1958.
101. Makino, S., T. Ishihara and A. Tonomura: Cytological studies on tumors. XXVII. The chromosomes of thirty human tumors. *Zschr. Krebsf.* 63, 184-208, 1960.
102. Matolczy, T. v.: Über gelungene heteroplastische Übertragung von Mäusekrebs. *Zschr. Krebsf.* 41, 163-165, 1955.
103. Moorhead, P. S. and T. C. Hsu: Cytological studies on HeLa, a strain of human cervical carcinoma. III. Durations and characteristics of the mitotic phases. *J. Nat. Canc. Inst.* 16, 1047, 1956.
104. Nachtsheim, H.: Chromosomenaberrationen beim Menschen und ihre Bedeutung für die Entstehung von Mißbildungen. *Naturwissenschaften* 47, 361-371, 1960.
105. Nowell, P. C. and D. A. Hungerford: Chromosome studies on normal and leukemic human leucocytes. *J. Nat. Canc. Inst.* 25, 85-109, 1960.
106. Nowell, P. C. and D. A. Hungerford: Chromosome studies in human leukaemia. II. Chronic granulocytic leukaemia. *J. Nat. Canc. Inst.* 27, 1013-1035, 1961.

107. Ohno, S. and T. S. Hauschka: Allocycl of the X-Chromosome in tumors and normal tissue. *Canc. Res.* 20, 541-545, 1960.
108. Ohno, S., E. T. Kovacs and R. Kinoshita: A Robertsonian type of chromosomal change in L 4946 ascites lymphoma. *J. Nat. Canc. Inst.* 24, 1187-1194, 1960.
109. Patti, J. and J. J. Biesele: Heterologous growth and passages of mouse sarcomas in hamsters. *Canc. Res.* 11, 540-542, 1951.
110. Pohle, K., K. Meng und E. Matthies: Die 24-stündige Mitoserhythmik beim S₂-Ascites-Sarkom und beim Ehrlich-Ascites-Carcinom der weißen Mäuse. *Zschr. Krebsf.* 64, 208-214, 1961.
111. Putnoky, J.: Über die heteroplastische Transplantation des Ehrlichschen überimpfbaren Mäusetumors. *Zschr. Krebsf.* 32, 520-524, 1930.
112. Querner, H.: Herstellung und cytologische Eigenschaften von Klonen des Ehrlichschen Mäuseascitestumors. *Zschr. Krebsf.* 60, 307-315, 1955.
113. Rabes, H.: Untersuchungen über humorale Abwehrreaktionen gegen Impftumoren an Parabioseratten. *Zschr. Krebsf.* 64, 1919-1999, 1961.
114. Ruddle, F. H., L. Berman and C. S. Stuhlberg: Chromosome analyses of five long-term cell culture populations derived from non-leukemic human peripheral blood. *Canc. Res.* 18, 1048, 1958.
115. Rutishauser, A.: Chromosome distribution and spontaneous chromosome breakage in *Trillium grandiflorum*. *Hereditas* 10, 367-407, 1956.
116. Rutishauser, A.: Cytogenetik transplantabler tierischer und menschlicher Tumoren. *Naturf. Ges. Zürich* 1962.
117. Saksela, E.: The effect of different human sera on the karyologic picture of the HeLa-cells. *Helsinki* 1962.
118. Sachs, L. and R. Gallily: The chromosomes and transplantability of tumors. I. Fundamental chromosomal number and strain specificity in ascites tumors. *J. Nat. Canc. Inst.* 15, 1267-1289, 1955.
119. Sachs, L. and R. Gallily: The chromosomes and transplantability of tumors. II. Chromosome duplication and the loss of strain specificity in solid tumors. *J. Nat. Canc. Inst.* 15, 215-237, 1954.
120. Sanford, K. K., G. D. Lickely and W. R. Earle: The development of variations in transplantability and morpho-

- logy within a clone of mouse fibroblasts transformed to sarcoma producing cells in vitro. J. Nat. Canc. Inst. 15, 215-237, 1954.
121. Sanford, K. K., G. L. Hobbs and W. R. Earle: The tumorproducing capacity of strain L-mouse-cells after ten years in vitro. Canc. Res. 16, 162-166, 1956.
 122. Sanford, K. K., R. M. Merwin, G. L. Hobbs and M. C. Fioramonti: Studies on the difference in sarcoma producing capacity of two lines of mouse cell derived in vitro from one cell. J. Nat. Canc. Inst. 20, 121-146, 1958.
 123. Schairer, E.: Untersuchungen über die Zahl und Art der Chromosomen beim Mäuseascites. Zschr. Krebsf. 60, 460-469, 1955.
 124. Schulz, J.: Malignancy and the genetics of the somatic cell. Ann. N. Y. Acad. Sc. 71, 994-1008, 1957.
 125. Schümmelfelder, N. und W. Wessel: 1. Entstehung und biologische Eigenschaften des M-Ca-Ascites-Tumors der Maus. 2. Chromosomenbefund und -morphologie des Ehrlich- und M-Ca-Ascites-Tumors der Maus. Zschr. Krebsf. 61, 195-226, 1956.
 126. Stern, C.: The nucleus and somatic cell variation. J. Cell. and Compar. Phys. 52, Suppl. 1, 1958.
 127. Steward, R. N. and R. Bamford: The chromosomes and nucleoli of Medeola Virginiana. Amer. J. Bot. 29, 301-303, 1942.
 128. Stich, H. E.: The DNA-Content of tumor cells. II. Alterations during the formation of hepatoms in rats. J. Nat. Canc. Inst. 24, 1283-1297, 1960.
 129. Swanson, C. P.: Cytologie und Cytogenetik. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, 1960.
 130. Therman-Suomalainen, E.: Investigations on secondary constrictions in Polygonatum. Hereditas 35, 86-104, 1949.
 131. Therman, E. and S. Timonen: Inconstancy of human somatic chromosome complement. Hereditas 37, 266-279, 1951.
 132. Timonen, S. and E. Therman: The changes in the mitotic mechanism of human cancer cells. Canc. Res. 10, 431-439, 1950.
 133. Tjio, J. H. and A. Levan: Chromosome analyses of three hyperdiploid ascites tumors of the mouse. Lunds Univ. Arsskr. N. F. 50, 1954.
 134. Tjio, J. H. and A. Levan: The chromosome number of man. Hereditas 42, 1-6, 1956.

135. Tjio, J. H. and A. Levan: Comparative idiogram analyses of rat and Yoshida-Sarcoma. *Hereditas* 42, 218-234, 1956.
136. Tjio, J. H. and T. T. Puck: Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J. Exp. Med.* 108, 259-268, 1958.
137. Wakoning, R. and H. F. Stich: Chromosomes in primary and transplanted leukemias of AKR-mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 25, 295-305, 1960.
138. Winge, Ö.: Cytologische Untersuchungen über die Natur maligner Tumoren. II. Teercarcinome bei Mäusen. *Zschr. Krebsf.* 10, 683-735, 1930.
139. Wrba, H.: Wachstum der heterotransplantierten Mäuse-Ratten-Tumoren auf unvorbehandelte Goldhamster. *Naturwissenschaften* 46, 339, 1959.
140. Wrba, H.: Beobachtungen am Yoshida-Sarkom bei heterologem Wachstum. *Naturwissenschaften* 47, 188-189, 1960.
141. Wrba, H.: Zur Induction einer Resistenz gegen Colchicin in heterologen Geschwülsten der Goldhamster. *Klin. Wochenschrift* 38, 770, 1960.
142. Wrba, H. und H. Rabes: Die Entstehung stabiler colchicin-resistenter Stämme von Impftumoren durch heterologe Passagen. *Zschr. Krebsf.* 64, 348-352, 1961.
143. Wrba, H. und H. Rabes: Spontane und induzierte Wandlungen in Biologie und Wachstum von Geschwülsten. *Zschr. Krebsf.* 65, 316-324, 1963.
144. Wrba, H. und M. Ripoll-Gómez: Die cytologische Analyse des spontan heterotransplantablen Stammes MR-RM des Walker-Carcinoms in Ascitesform. *Zschr. Krebsf.* 63, 439-446, 1960.
145. Wrba, H. und M. Ripoll-Gómez: Zur Biologie des heterolog wachsenden Yoshida-Sarkoms (Stamm MY-RY). *Zschr. Krebsf.* 63, 580-585, 1960.
146. Wrba, H., J. Eicke und M. L. Meiners: Veränderungen im Chromosomensatz heterolog wachsender Tumoren.
147. Wrba, H., J. Eicke, M. L. Meiners und A. Emminger: Cytogenetische Untersuchungen an einem heterotransplantablen Ascites-Hepatoma in vivo und im Explantat. *Zschr. Krebsf.* (im Druck).
148. Yoshida, T. H.: Origin of V-shaped chromosomes occurring in tumor cells of some ascites tumors in the rat. *Proc. Jap. Acad.* 31, 237-242, 1955.
149. Yoshida, T. H.: Contributions of the ascites hepatoma to the concept of malignancy of cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sc.* 63, 852-880, 1956.

150. Yoshida, T. H.: Studien über das Ascites-Hepatom. Virchows Arch. Path. Anat. 330, 85-105, 1957.
151. Yoshida, T. H.: Zelluläre Multizentrizität der Krebsentstehung. Studium am Ascites-Hepatom der Ratte. Dtsch. Med. Wochenschrift 46, 2229-2238, 1963.



Abb. 1 Metaphase des Walker-Ascites-Carcinoms (Stamm W) nach
Heterotransplantation auf die Ratte. (W 38, 63 Chromosomen)
a (oben) : Metaphaseplatte
b (unten) : Karyogramm
Markierungschromosom: siehe Pfeil bzw. Kreis

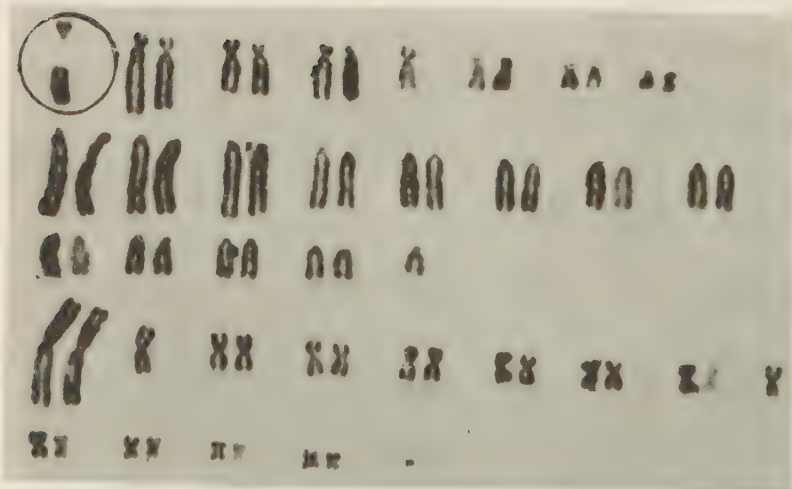
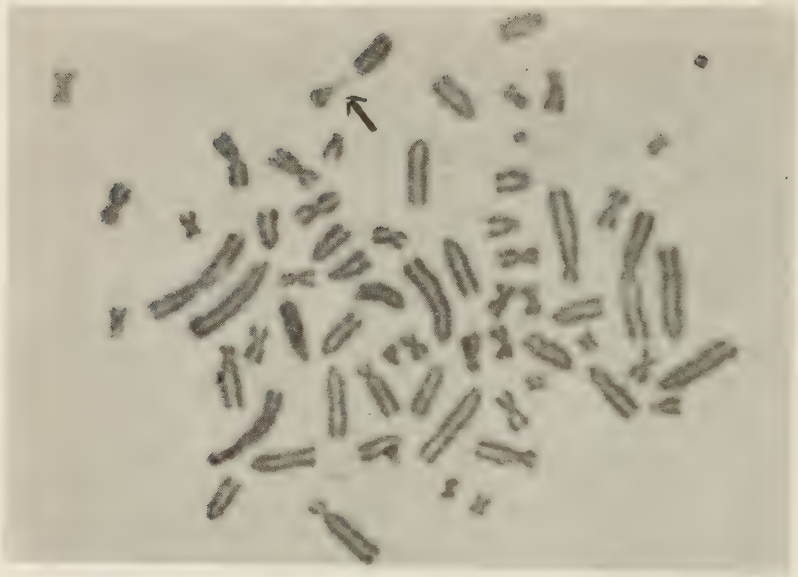


Abb. 2 Metaphase des Walker-Ascites-Carcinoms (Stamm W) nach
Heterotransplantation auf die Maus. (MW 23, 64 Chromosomen)
a (oben) : Metaphaseplatte
b (unten) : Karyogramm
Markierungschromosom: siehe Pfeil bzw. Kreis

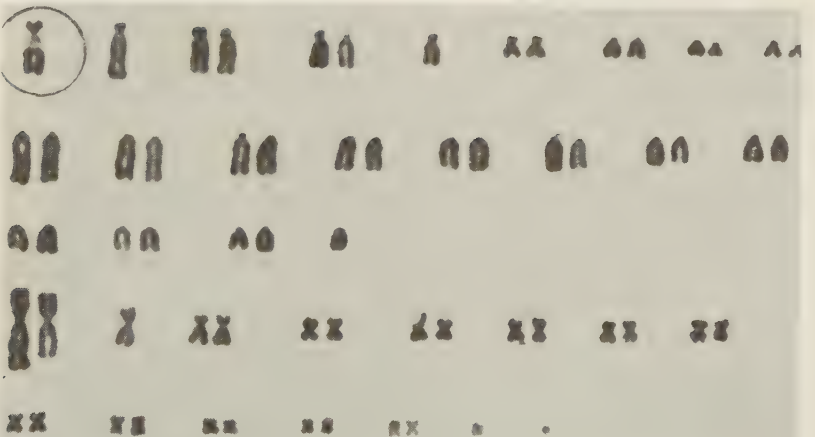
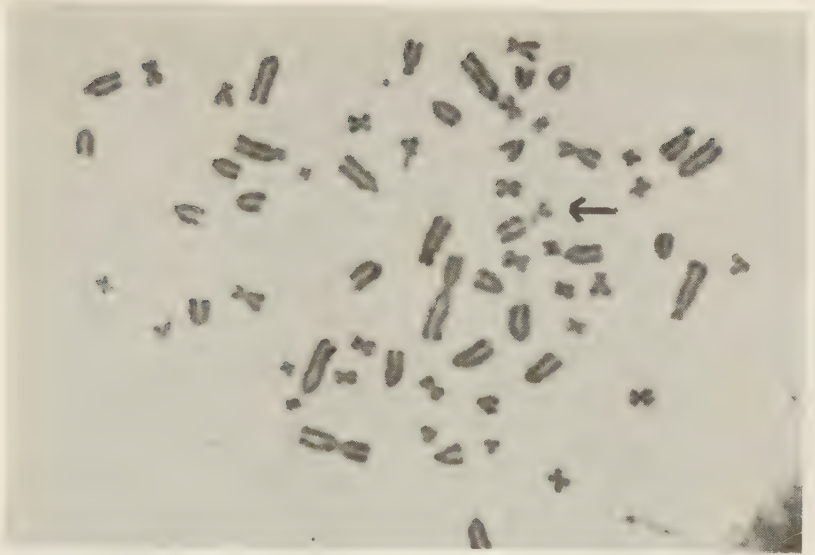


Abb. 3 Metaphase des Walker-Ascites-Carcinoms (Stamm W) nach Heterotransplantation auf den Hamster. (GW 5, 65 Chromosomen)
a (oben) : Metaphaseplatte
b (unten) : Karyogramm
Markierungschromosom: siehe Pfeil bzw. Kreis

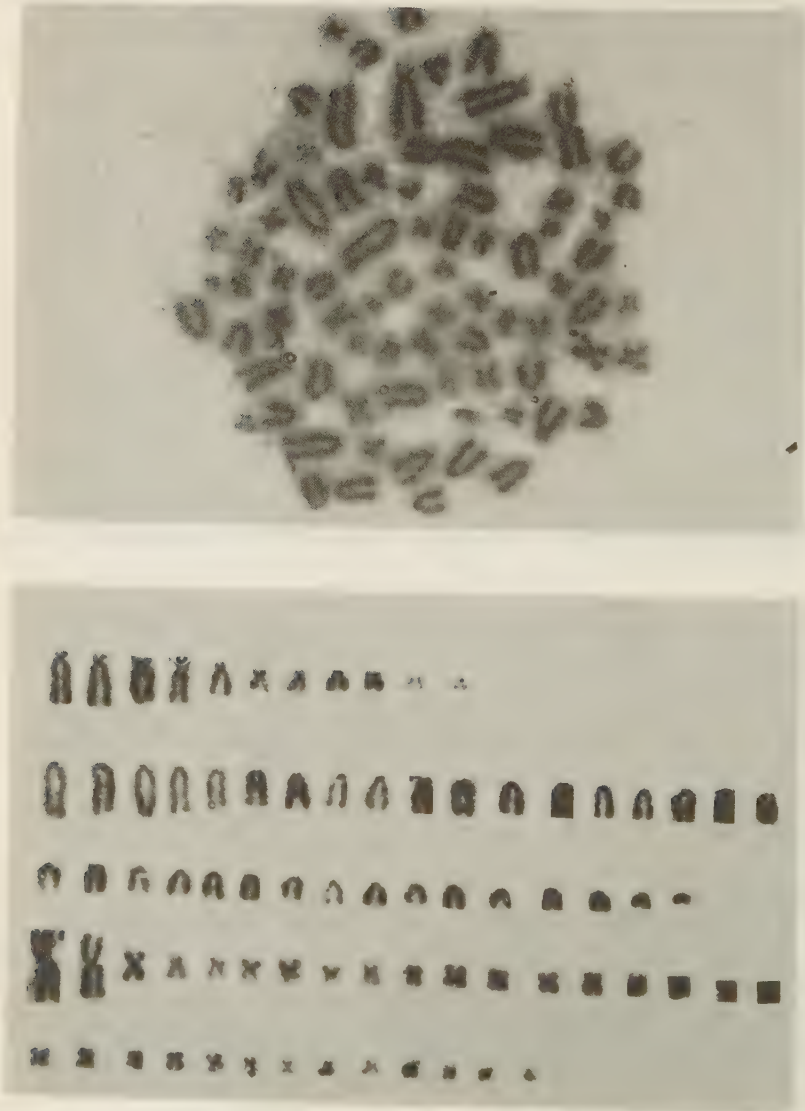


Abb. 4 Metaphase des Walker-Carcinoms (Heidelberger Stamm) in vitro.
(WKH 30, 76 Chromosomen)
a (oben) : Metaphaseplatte
b (unten) : Idiogramm

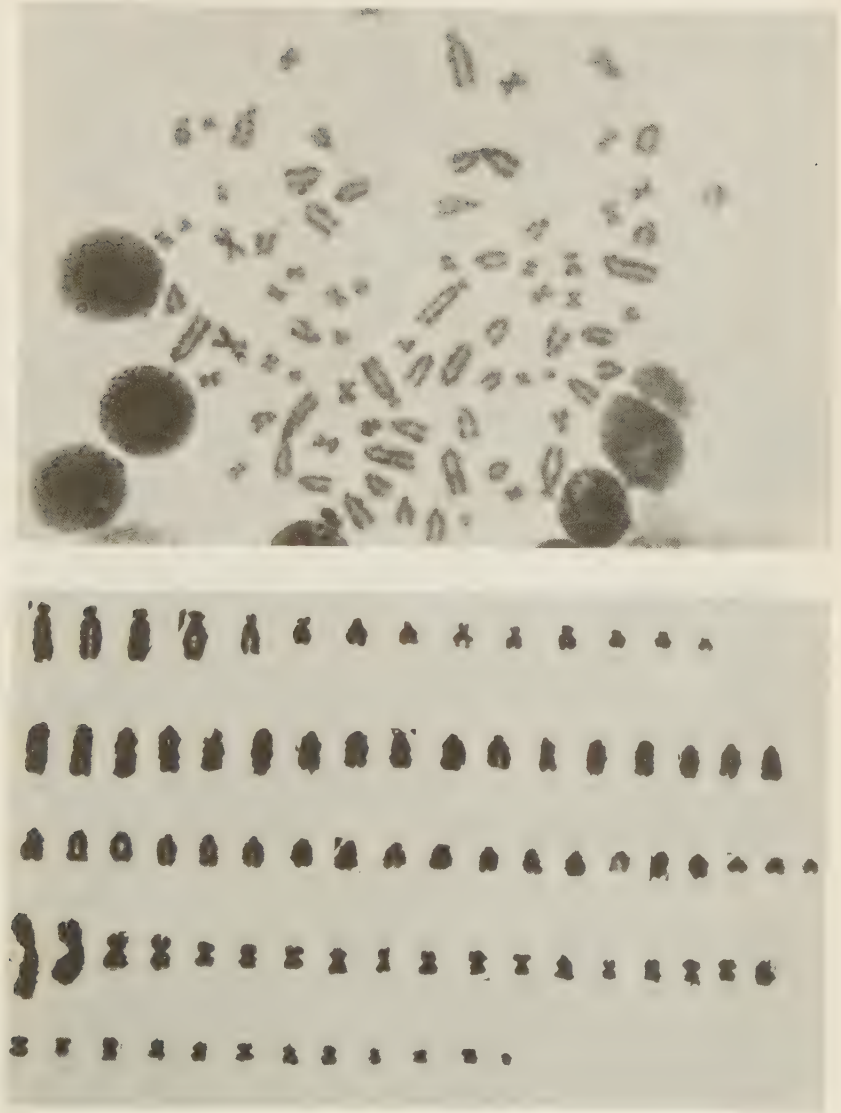


Abb. 5 Metaphase des Walker-Carcinoms (Heidelberger Stamm) nach Reimplantation ins Tier (Ratte). (WH 17, 80 Chromosomen)
a (oben) : Metaphaseplatte
b (unten) : Idiogramm

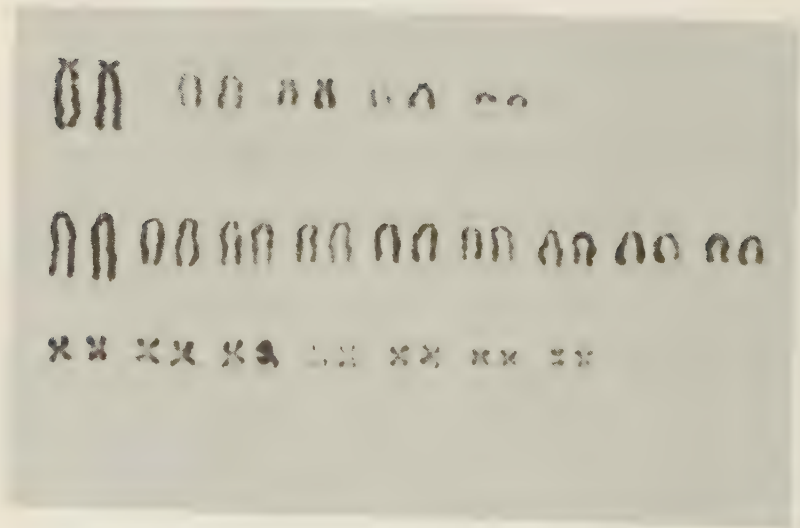
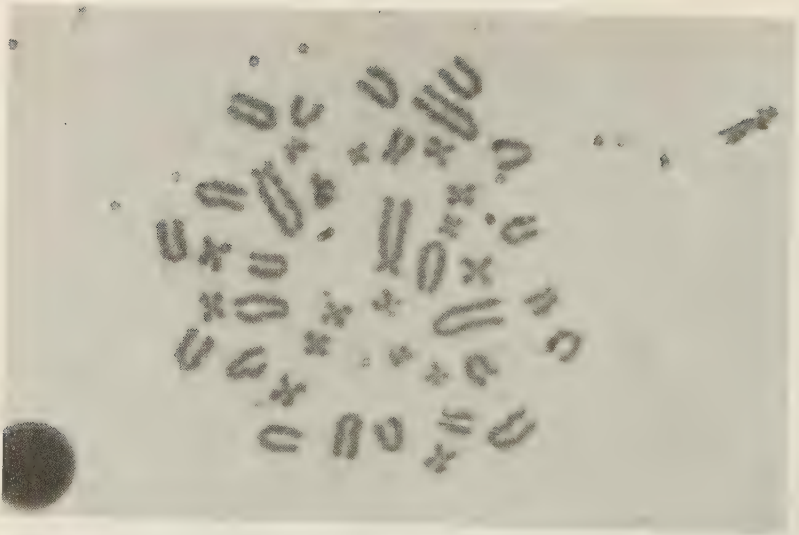


Abb. 6 Metaphase des Walker-Carcinoms (Heidelberger Stamm) nach Reimplatten ins Tier (Ratte). (WH 11, 42 Chromosomen)
a (oben) : Metaphaseplatte
b (unten) : Karyogramm

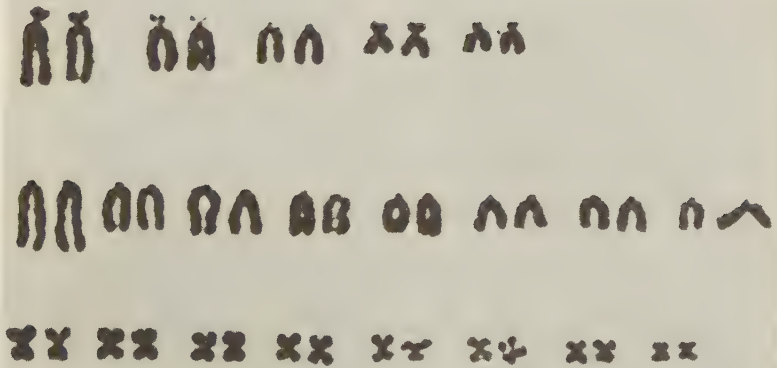


Abb. 7 Karyogramm einer normalen Rattenzelle.
(nach einer Metaphaseplatte eines von H. Busch (1962) be-
schriebenen Rattengenoms)

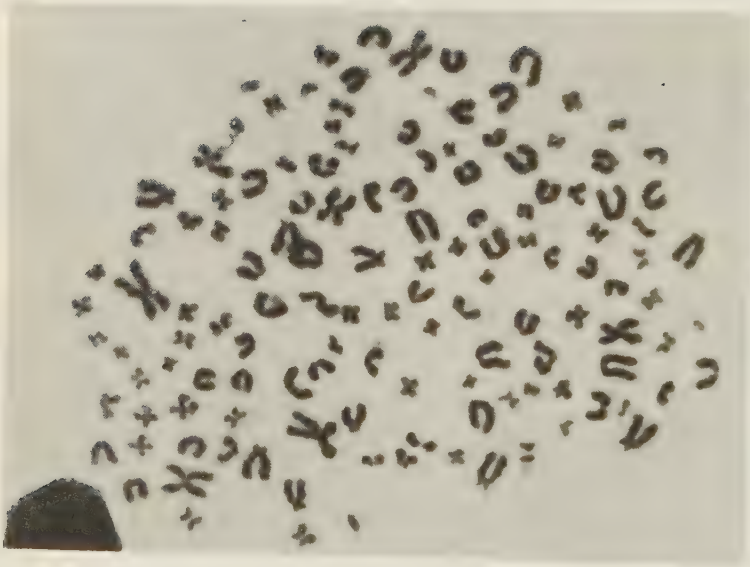


Abb. 8 Metaphase des Walker-Carcinoms (Heidelberger Stamm) in vitro
mit polyploidem Chromosomensatz.
(WKH 17, über 100 Chromosomen)

Lebenslauf

Am 17.1.1940 wurde ich als Tochter des Oberst a.D. Theodor Meiners ev. und seiner Ehefrau Lieselotte, geb. Staamann, ev. in Berlin-Schmargendorf geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule von 1946-1950 in Berlin, ab 1950 Besuch der Malwida-von-Meyenburg Oberschule Berlin (neusprachlicher Zweig), Ablegung des Abiturs 1959.

Mein Krankenpflegepraktikum (2 Monate) machte ich im Frühjahr 1959 (Universitäts-Klinik Westend, Berlin) und Herbst 1959 (Humboldt-Krankenhaus, Berlin).

Ab Mai 1959 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, nach 2 Semestern legte ich die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Weitere 3 Semester an der Universität Berlin. Weiterstudium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, 1962 hier Ablegung der ärztlichen Vorprüfung.

Ab Wintersemester 1962/63 bin ich an der Ludwig-Maximilians-Universität München immatrikuliert und beabsichtige, hier im Frühjahr 1965 mein Staatsexamen abzulegen.

Im Frühjahr 1963 begann ich meine Arbeit am Pathologischen Institut bei Prof. Wrba, Abteilung Gewebszüchtung und Cytogenetik.

Im Herbst 1964 konnte ich die vorliegende Dissertation beenden.

